

FRANZISKA FUCHS

**Untersuchungen zur Rolle des Transkriptionsfaktors
NF-IL6 in der Hypothalamus-Hypophysen-Achse
bei Ratten und Mäusen nach psychologischem
und inflammatorischem Stress**



INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2013

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2013

© 2013 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie und -Biochemie der
Justus-Liebig-Universität Gießen**

Betreuer: PD Dr. Christoph Rummel

**Untersuchungen zur Rolle des Transkriptionsfaktors
NF-IL6 in der Hypothalamus-Hypophysen-Achse bei
Ratten und Mäusen nach psychologischem und
inflammatorischem Stress**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

gingereicht von

Franziska Fuchs

Tierärztin aus Wiesbaden (Hessen)

Gießen 2013

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter: PD Dr. Christoph Rummel
PD Dr. Martin Schmidt

Tag der Disputation: 22.05.2013

“Make it simple, but significant.” by Don Draper

Meiner Familie

I. EINLEITUNG.....	6
1. Funktion und Aufbau der Bluthirnschranke (BHS).....	7
2. Circumventrikuläre Organe (CVO)	8
3. Signalwege zwischen Immun- und zentralem Nervensystem ...	9
3.1. Die Akute-Phase-Reaktion (APR).....	10
3.2. Der humorale Signalweg	10
3.3. Der neuronale Signalweg.....	11
4. Die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse..	12
4.1. Anatomischer Aufbau der HPA-Achse	13
4.2. Das Protein POMC (Proopiomelanocortin)	18
4.3. Nebenniere (<i>Glandula suprarenalis</i>).....	19
4.4. Die Aktivierung der HPA-Achse (basal und in Stresssituationen)	19
4.5. Die potenzielle Bedeutung der sCVO's bei der Aktivierung der HPA-Achse	22
5. Transkriptionsfaktoren.....	24
5.1. NFκB.....	25
5.2. STAT3	26
5.3. NF-IL6	27
5.4. Das anatomische Verteilungsmuster von LPS-induzierten NF-IL6-Signalen sowie Phänotypen reagierender Zellpopulationen im Gehirn	31
5.5. NF-IL6 in der Thermoregulation und die Entstehung von Fieber	32
5.6. Die Rolle von NF-IL6 in der HPA-Achse.....	33
6. Lipopolysaccharid (LPS)	34
7. Zytokine	35
7.1. Zytokine und physischer oder emotionaler Stress.....	37
7.2. Tumornekrosefaktor (TNF)	37
7.3. Interleukin 1 (IL-1).....	40
7.4. Interleukin 6 (IL-6).....	42
7.5. Interleukin 10 (IL-10).....	44
8. Ziele und Fragestellungen der Arbeit.....	46
II. MATERIAL UND METHODEN.....	49
1. Technische Geräte	49

2. Software	51
3. Chemikalien und Substanzen	52
4. Medikamente und OP-Bedarf	53
5. Antikörper	54
5.1. Primärantikörper	54
5.2. Sekundärantikörper	55
6. Ge- und Verbrauchsmaterialien	56
6.1. Allgemein	56
6.2. Tierhaltung	57
6.3. Immunhistochemie und Immunzytochemie	58
6.4. Zellkultur	58
6.5. Genotypisierung und Gel-Elektrophorese	59
6.6. Quantitative Real-Time-PCR	59
6.7. TNF- α und IL-6 Bioassays	60
7. In vivo Versuche	61
7.1. Versuchstiere	61
7.2. Telemetrie und Klimakammer	74
8. Erfassung physiologischer Daten	75
8.1. Messung von Körpertemperatur und motorischer Aktivität	75
8.2. Rattensender	75
8.3. Mäusesender	76
8.4. Erfassung von Futter- und Wasseraufnahme	78
8.5. Entwicklung der Körpermasse	78
8.6. Operationen	79
8.7. Stimulation der Versuchstiere und Injektionen	81
8.8. Perfusion und Organentnahme	82
9. Erfassung biochemischer Parameter	85
9.1. Immunhistochemie und Immunzytochemie	85
9.2. Zytokinbioassay für die Zytokine IL-6 und TNF- α	90
9.3. Quantitative Real-Time PCR	96
10. In vitro Versuche	104
10.1. Primäre Zellkultur des Hypophysenvorderlappens (HVL)	104

III. ERGEBNISSE.....	109
11. Qualitative Auswertung der NF-IL6 Immunreaktivität in ausgewählten Regionen des Mäusegehirns	109
12. Charakterisierung der Aktivierung entscheidender Transkriptionsfaktoren im Verlauf von LPS-induzierten Entzündungsreaktionen in der Hypophyse von Ratten.....	112
12.1. Charakterisierung der NF-IL6-Immunreaktivität im zeitlichen Verlauf und in Abhängigkeit von der LPS Dosis	112
12.2. NFκB- und STAT3-Aktivität sowie die Interaktion mit NF-IL6.....	115
12.3. Identifizierung der verschiedenen NF-IL6-immunreaktiven Zellphänotypen	117
13. Charakterisierung der NF-IL6-Reaktivität im Hypothalamus und in der Hypophyse von Ratten nach Open Field Stress	122
13.1. Physiologische Parameter und Plasmazytokine nach Open Field Stress	122
13.2. Molekulare und immunhistochemische Analysen der Rattengehirne.	129
14. Charakterisierung der Bedeutung von Zytokinen für die Aktivierung von NF-IL6 bei LPS-induzierten Entzündungen anhand primärer Zellkulturen des HVL der Ratte	142
14.1. Immunzytochemische Analysen und Messung von Zytokinen in Überständen der primären HVL-Zellkultur.....	142
14.2. Charakterisierung der NF-IL6- und TNF-α-Immunreaktivität nach LPS-Stimulation.....	144
14.3. Charakterisierung der ACTH-Immunreaktivität nach LPS-Stimulation	149
15. Charakterisierung von veränderten, physiologischen Parametern im Verlauf LPS-induzierter Entzündungsreaktionen bei homozygoten, NF-IL6-defizienten Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Geschwistern	153
15.1. Veränderungen der physiologischen Parameter in Abhängigkeit von zwei verschiedenen, systemisch verabreichten LPS-Dosen.....	153
IV. DISKUSSION.....	165
16. NF-IL6-Immunreaktivität im Gehirn der Maus.....	165

17. NF-IL6 in der LPS-induzierten bzw. stressinduzierten Aktivierung der HPA-Achse.....	166
17.1. NF-IL6 als Aktivierungsmarker in der Hypophyse im zeitlichen Verlauf nach LPS-Stimulation.....	168
17.2. NF-IL6-Interaktion mit NF κ B und STAT3 im HVL nach LPS-Stimulation.....	168
17.3. NF-IL6-immunreaktive Zellphänotypen und ihre mögliche Funktion in der Hypophyse von Ratten nach einem infektiösem oder einem psychologischen Stimulus	170
17.4. Beteiligung von NF-IL6 und anderen Transkriptionsfaktoren an der ACTH-Synthese in corticotropen Zellen der Hypophyse	173
18. „Effekte“ des Open Field Stress Experiments und der mögliche Zusammenhang mit NF-IL6	174
18.1. Stressinduzierte Erhöhung der Körperkerntemperatur bei Ratten	174
18.2. Stressinduzierte Erhöhung der motorischen Aktivität bei Ratten	177
19. Weitere Auswirkungen des NF-IL6-Knock-outs auf die murine Thermoregulation	181
19.1. Beobachtete „Nebeneffekte“ des NF-IL6-Knock-outs	184
20. Aktivierung von NF-IL6 durch proinflammatorische Zytokine in der Hypophyse im Rahmen LPS-induzierter Entzündungen	185
20.1. Synthese von TNF- α und IL-6 in der LPS-stimulierten Hypophyse ..	185
20.2. Aktivierung von NF-IL6 und anderen Transkriptionsfaktoren im Zytokinmilieu des HVL	187
21. Fazit und Ausblick.....	192
V. ZUSAMMENFASSUNG.....	195
VI. SUMMARY	199
VII. ABKÜRZUNGEN.....	203
VIII. LITERATURVERZEICHNIS	206
IX. ANHANG.....	237
22. Publikationen	237
22.1. Zitierbare Kurzmitteilungen	237

23. Danksagung	238
24. Erklärung	239

I. EINLEITUNG

In der vorliegenden Arbeit soll die potenzielle Rolle des Transkriptionsfaktors NF-IL6 bei der Kommunikation zwischen Immunsystem und zentralem Nervensystem während peripherer Entzündungsreaktionen näher untersucht werden. Die einmalige Gabe eines peripheren Immunstimulus, z. B. durch Injektion sog. PAMPS („pathogen-associated molecular patterns“) wie LPS, kann zentralnervös kontrollierte Krankheitssymptome wie Fieber und andere zum Komplex des sog. „sickness behavior“ gehörende Erscheinungen (Anorexie, Adipsie oder Lethargie) verursachen (Roth et al., 2006). Der gesamte Organismus reagiert mit einer unspezifischen Abwehrreaktion, der sog. Akute-Phase Reaktion (APR). Das Immunsystem existiert aber nicht gesondert, sondern ist ein Bestandteil einer Gesamtheit, die die Homöostase und somit das Überleben des Organismus gewährleistet. Dies kann nur dann funktionieren, wenn ein ständiger Informationsaustausch und somit eine komplexe, direkte oder indirekte Kommunikation stattfindet, so dass jeder/s „Mitspieler/Organsystem“ weiß, wie die aktuelle Lage ist und wie sich der Körper anpassen kann. Es existieren drei Systeme: das Immunsystem, das Nervensystem und das endokrine System, die über Botenstoffe die notwendige Kommunikation ermöglichen. Vor allem Zytokine, die als Informationsübermittler bei entzündlichen Prozessen im gesamten Körper wirken, befinden sich im Fokus dieser hier vorliegenden Arbeit. Bekannt ist bereits, dass die Stimulation des Immunsystems bei Ratten Aktivierungen in regulatorischen Gehirnzentren hervorruft, was kürzlich z. B. anhand der Aktivierungsmuster von Transkriptionsfaktoren wie NF-IL6 im Gehirn in einer Dissertation nachgewiesen werden konnte (Damm, 2012). Allerdings gibt es nur wenige Informationen darüber, welche Rolle die von Frau Dr. Damm nachgewiesene NF-IL6-Aktivierung im Verlauf LPS-induzierter Entzündungsreaktionen im Gehirn und den damit zusammenhängenden, zentralnervös kontrollierten Krankheitssymptomen in verschiedenen Spezies (Ratte vs. Maus) spielt. Ebenso ist bisher unklar, ob und wie dieser Transkriptionsfaktor auch an stressinduzierten Anpassungen von Gehirnfunktionen und daraus resultierenden Auswirkungen auf den gesamten Organismus beteiligt ist. In diesem Zusammenhang werden vorwiegend der Hypothalamus und die Hypophyse als Bereiche der NF-IL6-Aktivierung in Verbindung mit dem Immunsystem sowie unter Miteinbeziehung des endokrinen Systems untersucht. Gerade Stress als Aktivator der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HPA-Achse), gewinnt in der heutigen Gesellschaft eine stetig wachsende Bedeutung (siehe Kapitel 4). Auch deshalb wird dieses Regelsystem im Zusammenhang mit NF-IL6 tiefergehend durchleuchtet. Die Aktivierung der HPA-Achse hat die Aktivierung von Corticotropin-Releasing Hormon (CRH)-Neuronen im Hypothalamus und eine Ausschüttung von Adrenocorticotropem Hormon (ACTH) aus dem Hypophysenvorderlappen zur Folge. Das ACTH induziert seinerseits die Freisetzung von antiinflammatorischen Corticosteroiden aus der Nebenniere, welche über einen sog. negativen Feedback-Mechanismus im Bereich des Hypothalamus und der Hypophyse einer übermäßigen Aktivierung der Stress-Achse entgegenwirken. Um einen weiteren Beitrag zur

Aufklärung von Aufgaben und Funktionen des Transkriptionsfaktors NF-IL6 als später Zellaktivierungsmarker bei systemischen Entzündungen leisten zu können, erfolgt außerdem die Untersuchung von einigen physiologischen Parametern bei NF-IL6-defizienten Mäusen (siehe Kapitel 15). Dies soll weitere wichtige Zusammenhänge zwischen NF-IL6, der Reaktion auf periphere Immunstimuli mit Fieber und „sickness behavior“ sowie der Aktivierung der HPA-Achse aufzeigen.

1. Funktion und Aufbau der Bluthirnschranke (BHS)

Alle Lebewesen mit einem gut entwickelten zentralen Nervensystem (ZNS) besitzen eine Blut-Hirn-Schranke (BHS) (Abbott, 2005). Um eine störungsfreie neuronale Aktivität und die Erhaltung eines stabilen extrazellulären Umfeldes (Homöostase) im ZNS zu ermöglichen, schützt die Blut-Hirn-Schranke zusammen mit der Blut-Liquor-Schranke vor potenziell giftigen oder neuroaktiven exogenen und endogenen „Fremdstoffen“, pathogenen Erregern (Bakterien, Viren) und anderen „Fremdproteinen“ aus der Peripherie (endokrine Hormone, Zytokine). Durch pathophysiologische Vorgänge kann die Durchlässigkeit der BHS jedoch verändert werden, so dass diese Schutzfunktion beeinträchtigt ist (Ohtsuki, 2004). Die BHS besteht aus Endothelzellen, die die Wand der Gehirnkapillaren bilden, der Basalmembran mit Perizyten und den umgebenden Astrozytenausläufern (Abbildung 1-1). Der *Plexus choroideus* und die *Arachnoidea* bilden die Blut-Liquor-Schranke (Abbott and Friedman, 2012). An jeder Übergangsstelle der BHS wird die Aufrechterhaltung der Barriere durch spezialisierte Zell-zu-Zell-Kontakte („tight junctions“ oder *Zonulae occludentes*), spezifische Transportsysteme zur Kontrolle des Stoffaustausches sowie zur Nährstoffversorgung und durch Enzyme zur Verarbeitung von zu transportierenden Molekülen gewährleistet (Abbott et al., 2006). Substanzen, die die BHS problemlos durchdringen können, müssen lipophil oder niedermolekular (<90 Da) und kleiner als 0,2 nm sein. Das bedeutet, dass die hydrophilen Zytokine (sehr wichtige Informationsübermittler bei entzündlichen Prozessen im gesamten Organismus) mit einem Molekulargewicht von 15-25 kDa keine Möglichkeit haben durch eine funktionierende BHS zu diffundieren (Watkins et al., 1995). Nur eine sehr geringe Menge an Zytokinen kann über aktive, sättigbare Mechanismen durch die BHS transportiert werden (Banks et al., 1991, Gutierrez et al., 1993, Banks et al., 1994). Daraus lässt sich schließen, dass die Menge an Zytokinen, die auf diesen Wegen in das Gehirn gelangt, zu niedrig ist, um z. B. im Falle eines entzündlichen Stimulus Funktionen des ZNS zu beeinflussen bzw. in gemeinhin als „Stress“ zusammengefassten Situationen die HPA-Achse zu aktivieren (Banks et al., 1991, Conti et al., 2004). In den Kapiteln 3.2 und 3.3 wird erläutert, wie trotz der Barrierefunktion der BHS das Immunsystem und das zentrale Nervensystem im Fall von Entzündungen oder Stress miteinander kommunizieren können.

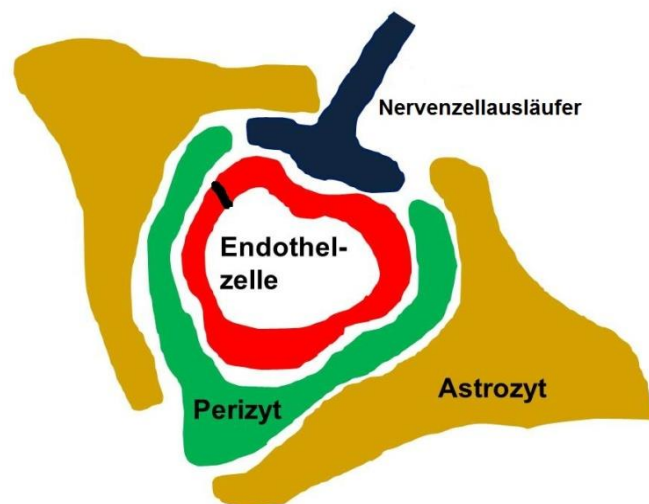


Abbildung 1-1

Schematischer Aufbau der Blut-Hirn-Schranke (BHS)

Die BHS besteht aus drei Schichten: 1. den Endothelzellen, die über „tight junctions“ lückenlos miteinander verbunden sind, 2. der Basalmembran (nicht dargestellt) und den im perivaskulären Raum befindlichen Perizyten und 3. den Fortsätzen der Astrozyten, die mit den Endothelzellen in Verbindung stehen und an der Gehirnseite lokalisiert sind.

Abbildung modifiziert nach (Abbott et al., 2010).

2. Circumventrikuläre Organe (CVO)

Es gibt im Gehirnparenchym Bereiche, die sich vom Rest des Gehirns durch eine fehlende BHS, einer sehr hohen Gefäßdichte und das Vorkommen von spezialisierten, ependymalen Zellen unterscheiden. Diese Circumventrikulären Organe liegen, wie der Name vermuten lässt, um die Ventrikel des Gehirns und besitzen an ihrer Oberfläche sog. Ependymozyten, die über „tight junctions“ verbunden sind und sog. Tanyzyten, die mit ihren zahlreichen Fortsätzen Kontakt zwischen der Cerebrospinalflüssigkeit und den CVO's herstellen (McKinley et al., 2003). Des Weiteren setzen sich die CVO's aus Gliazellen, Dendriten und Axonen zusammen. Generell besteht ihre Aufgabe in der Aufrechterhaltung des Elektrolyt- und Flüssigkeitshaushaltes und der Beeinflussung der Körpertemperatur, der Immunantwort sowie des kardiovaskulären Systems (McKinley et al., 1999).

Insgesamt gibt es sieben CVO's, wovon vier als „sekretorisch“ und drei als „sensorisch“ bezeichnet werden (Cottrell and Ferguson, 2004). Die sekretorischen CVO's beinhalten die Neurohypophyse, die *Eminentia mediana* (ME) des Hypophysenstiels, die Epiphyse und das *Organum subcommissurale* (SCO) (Siso et al., 2010). Die Gruppe der sensorischen CVO's (sCVO) setzt sich zum einen aus dem *Organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT) und dem *Organum subfornicale* (SFO) zusammen, die in der Wand des dritten Ventrikels lokalisiert sind und zum anderen aus der *Area postrema* (AP), die sich in der Wand des vierten Ventrikels befindet (McKinley et al., 2003) (Abbildung 2-1). Sie zeichnen sich durch das zusätzliche Vorkommen von Neuronenzellkörpern aus, was sie besonders zur Aufnahme und Weiterleitung von Signalen aus dem Blutgefäßsystem befähigt.

Die CVO's verfügen, wie oben erwähnt, über einen direkten Kontakt zu den Ventrikeln und zur Cerebrospinalflüssigkeit und gewähren ihren Neuronen bzw. deren Ausläufern (sensorische CVO's) durch ein teilweise fenestriertes Endothel Kontakt zur Blutzirkulation des Körpers und somit zu allen darin befindlichen Stoffen und Mediatoren (Siso et al., 2010).

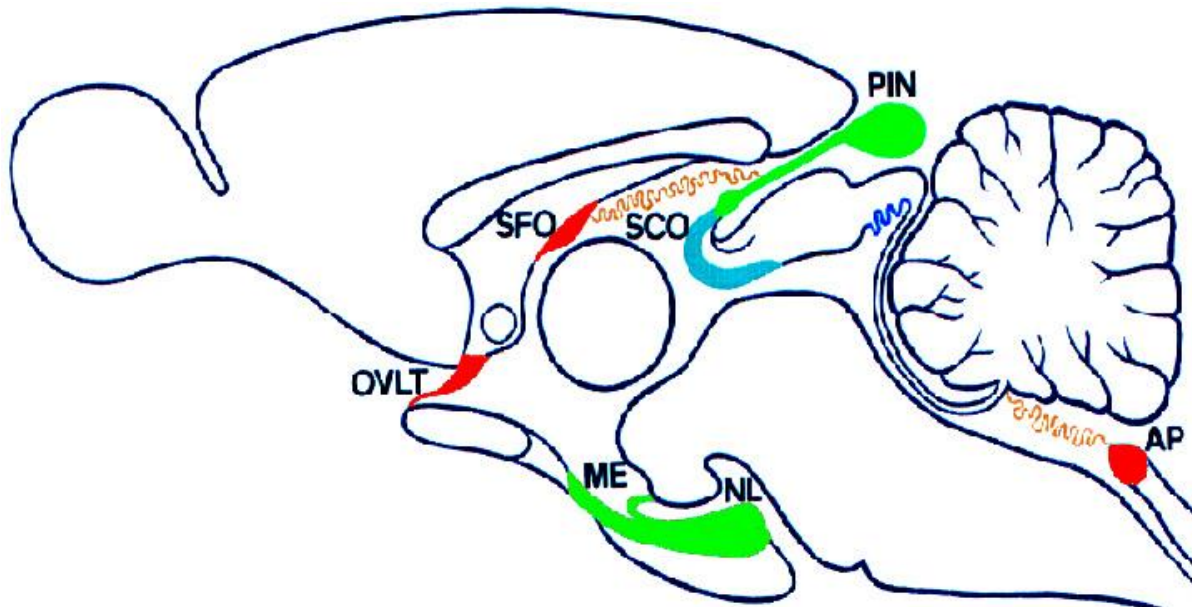


Abbildung 2-1

Schematische Übersicht zur anatomischen Lage der Circumventrikulären Organe (CVO's) der Ratte im Sagittalschnitt

Der *Plexus choroideus* ist in braun, die sensorischen CVO's in Rot und die neuroendokrinen CVO's in grün dargestellt, OVLT (*Organum vasculosum laminae terminalis*); SFO (*Organum subfornicale*); AP (*Area postrema*); SCO (*Organum subcommissurale*); ME (*Eminentia mediana*); NL (*Neurohypophyse*); PIN (*Organum pineale*)

Abbildung modifiziert nach (Roth et al., 2009).

3. Signalwege zwischen Immun- und zentralem Nervensystem

Die CVO's spielen ebenfalls eine wichtige Rolle, wenn bei der Verarbeitung von Stress oder der Reaktion des Immunsystems auf eine Infektion oder eine Entzündung in der Peripherie die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse aktiviert wird (Roth et al., 2004). Dabei fungieren sie als Schnittstelle, indem sie einerseits Hormonen des Hypothalamus erlauben ohne Unterbrechung der BHS in die Zirkulation zu gelangen und andererseits Substanzen aus dem Blut die Möglichkeit geben, die Gehirnfunktionen zu beeinflussen, obwohl sie die BHS nicht passieren können (Ganong, 2000).

Prinzipiell sind bisher im Rahmen einer Entzündung oder Infektion mit der Entstehung von Fieber der neuronale und der humorale Signalweg für die Kommunikation zwischen Immunsystem und dem ZNS bekannt. Zweck dieser Signalkaskaden ist unter anderem die Aktivierung der HPA-Achse, um eine überschießende Immunreaktion zu verhindern (Dantzer et al., 2000b). Es besteht die Gefahr, dass bei einem Ungleichgewicht der pro- und antiinflammatorischen Komponenten Krankheiten entstehen wie unkontrollierbare oder chronische Entzündungen, autoimmune Vorgänge (rheumatoide Arthritis), psychische

Störungen (Depressionen), Krebs und Diabetes (Calcagni and Elenkov, 2006, Pace et al., 2007).

3.1. Die Akute-Phase-Reaktion (APR)

Das Immunsystem arbeitet permanent, um das Eindringen von Pathogenen und die dadurch entstehenden Gewebeschäden zu verhindern. Durch die enge Zusammenarbeit des angeborenen und des erworbenen Immunsystems wird der Organismus vor Infektionen geschützt. Das angeborene Immunsystem wird unter anderem sofort aktiv, nachdem PAMPs an PPRs („pattern recognition receptors“) gebunden haben und stellt somit die erste „Verteidigungslinie“ dar. Toll-like Rezeptoren, die PAMPs binden, befinden sich auf der Oberfläche von Zellen des angeborenen und des erworbenen Immunsystems (neutrophile Granulozyten, Makrophagen, natürliche Killerzellen, dendritische Zellen und auch Endothelzellen) (Borghetti et al., 2009). Während einer Infektion führt vor allem die Konzentrationserhöhung von proinflammatorischen Zytokinen [Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukin-1 β (IL-1 β) und Interleukin-6 (IL-6)] zur Induktion der APR. Diese ist charakterisiert durch Fieber, Anorexie, Adipsie, Lethargie und hormonelle bzw. metabolische Veränderungen (Lipolyse, Gluconeogenese etc.) (Gruys et al., 2005). Die APR ist dann nutzbringend, wenn sie durch eine adäquate Antwort des Immunsystems das eingedrungene Pathogen vernichtet und das zerstörte Gewebe repariert werden kann (Berczi et al., 2000).

3.2. Der humorale Signalweg

Bei der Aktivierung des ZNS über den humoralen Signalweg (Abbildung 3-1) stellen aus der Peripherie stammende humorale Botenstoffe (z. B. Zytokine) die „Hauptakteure“ dar. Daneben scheinen Endothelzellen zum einen als „Informationsübermittler“ und zum anderen mit der Expression von Tumornekrosefaktor- α - und Interleukin-1-Rezeptoren (TNF- α -R und IL-1-R) sowie dem Glykoprotein gp130, als wichtigem Bestandteil beispielsweise des IL-6-Rezeptors, von großer Bedeutung zu sein (Vallières and Rivest, 1997). Zu den humoralen Botenstoffen gehören „fiebereerzeugende Stoffe“, das heißt sowohl endogene (TNF- α , IL-1 β , IL-6) als auch exogene Pyrogene (z. B. das Lipopolysaccharid (LPS), ein Bestandteil der Zellwand gram-negativer Bakterien). Diese interagieren unter anderem mit Rezeptoren an den Endothelzellen der BHS und können somit das inflammatorische Signal an die abluminale Seite und das ZNS weiterleiten, indem sie die Synthese von sekundären Mediatoren wie NO (Stickoxid) oder Prostaglandin E₂ (PGE₂) bzw. weiteren Zytokinen (TNF- α , IL-1 β , IL-6) induzieren. Diese wiederum stimulieren z. B. perivaskuläre Makrophagen (Bechmann et al., 2007) und Neurone im ZNS und führen schließlich zur Erhöhung der Körperkerntemperatur (Zeisberger, 1999, Conti et al., 2004, Matsumura and Kobayashi, 2004).

Auch im Bereich der sensorischen CVO's (OVLT und SFO) befinden sich Rezeptoren für Prostaglandine (Nakamura et al., 1999, Ek et al., 2000) und endogene Pyrogene wie TNF- α , (Nadeau and Rivest, 1999), IL-1 β und IL-6 (Ericsson et al., 1995, Vallières and Rivest, 1997) die an der Signalweiterleitung beteiligt sind.

Das exogene Pyrogen LPS kann direkt über den Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) und den Rezeptor CD („cluster of differentiation“) 14 mit Zellen der sCVO's interagieren. Hierbei sollte beachtet werden, dass im Gehirnendothel nur eine geringe Anzahl TLR4 vorhanden ist, so dass die direkte Wirkung von LPS für die Fieberentstehung möglicherweise eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint (Laflamme and Rivest, 2001, Rivest, 2003).

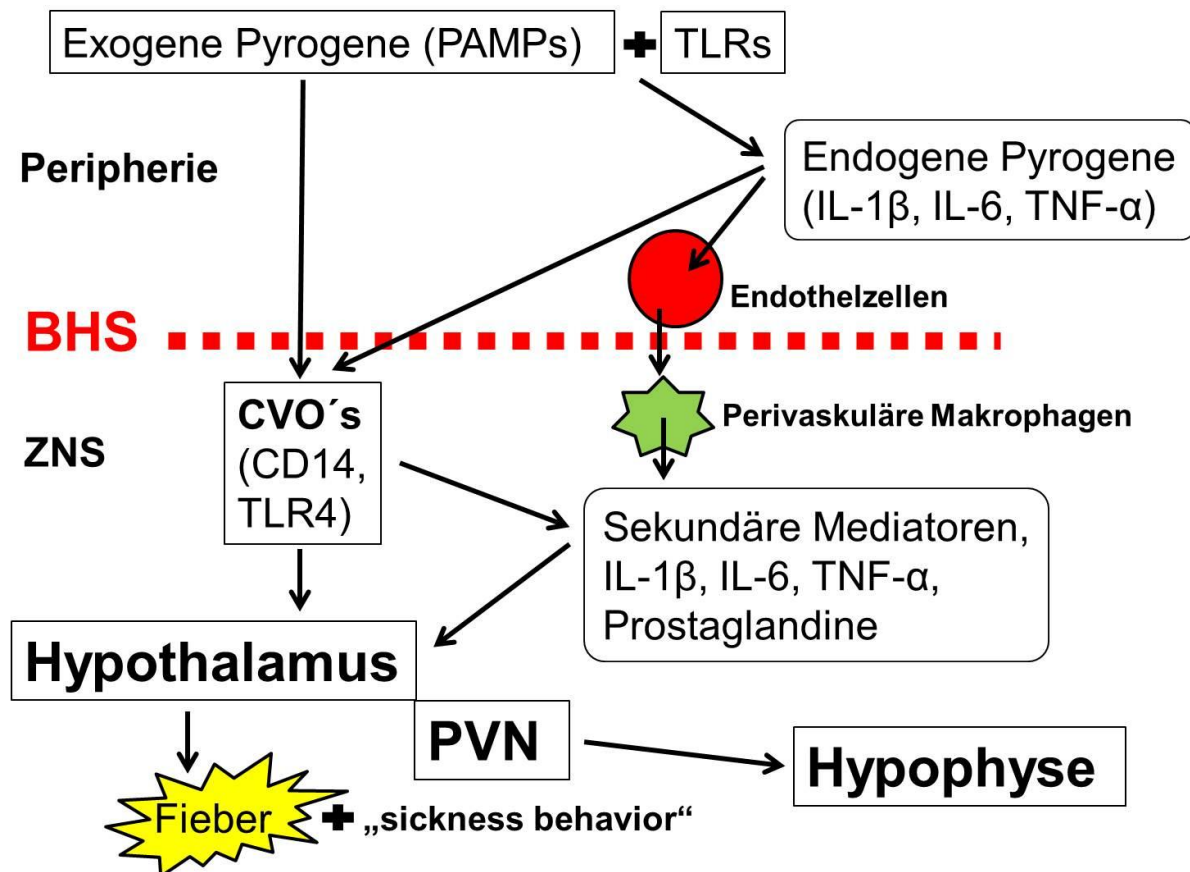


Abbildung 3-1

Schematische Darstellung des humoralen Signalweges.

In der Peripherie kommt es nach dem Eindringen eines exogenen Pyrogens (LPS) zur Produktion von endogenen Pyrogenen (z. B. durch mononukleäre Zellen), die in die Blutzirkulation gelangen. Über Endothelzellen, perivaskuläre Makrophagen, Zellen der *Glia limitans* oder einwandernde Immunzellen wie neutrophile Granulozyten, werden Zellen des ZNS zur Produktion von sekundären Mediatoren stimuliert.

Im Bereich der CVO's können zirkulierende Pyrogene direkt die Produktion von sekundären Mediatoren durch Astrozyten, Mikrogliazellen oder Neuronen stimulieren. Im ZNS aktivieren diese Mediatoren Neurone in hypothalamischen Kerngebieten, was zur Entstehung von Fieber mit entsprechendem "sickness behavior" und zur Aktivierung der HPA-Achse führt.

3.3. Der neuronale Signalweg

Der neuronale Signalweg wird auch als „Schnellstraße“ der Kommunikation zwischen Immunsystem und Gehirn bezeichnet (Dantzer et al., 2000a) und setzt keine erhöhte Konzentration von Zytokinen im Blutplasma voraus, da nach einem örtlich begrenzten inflammatorischen Stimulus lokal produzierte Mediatoren afferente Nervenendigungen

stimulieren und somit chemosensorische Signale aus der Peripherie in Form von Aktionspotentialen zum Gehirn weiterleiten können (Dantzer et al., 2008). Das Auftreten von zentralnervös kontrollierten Krankheitssymptomen bei lokalen inflammatorischen Ereignissen in der Peripherie weist also auf die Existenz dieses alternativen Signalweges hin (Watkins et al., 1995).

Es besteht die Annahme, dass der *Nervus vagus* (*N. vagus*) bei der neuronalen Form der Signalübertragung eine wichtige Rolle spielt. Bei Ratten konnte nach subdiaphragmaler Vagotomie gezeigt werden, dass zum einen trotz der Injektion von IL-1 β kein typisches „sickness behavior“ auftrat (Bluthe et al., 1996) und zum anderen, dass die LPS-induzierte Aktivierung der HPA-Achse vermindert werden konnte (Gaykema et al., 1995). Des Weiteren gelang nicht nur bei Ratten (Romanovsky et al., 1997), sondern auch bei Meerschweinchen (Sehic and Blatteis, 1996, Blatteis, 1997, Goldbach et al., 1997) die Unterdrückung von Fieber nach Applikation von exogenen Pyrogenen (LPS) und vorausgegangener Vagotomie. Allerdings muss beachtet werden, dass durch eine subdiaphragmale Vagotomie nur die Entstehung von monophasischem Fieber nach der intravenösen (i.v.) Injektion einer niedrigen LPS-Dosis (1 μ g/kg KGW) verhindert werden konnte und nicht das Auftreten von mehrphasischem Fieber nach der Injektion einer hohen Dosis (10 μ g/kg bis 1 mg/kg KGW). Dies lässt vermuten, dass der Einfluss der Signalübertragung über vagale Afferenzen von der Dosis abhängig ist und ab einem gewissen Entzündungsgrad von der humoralen Weiterleitung der Signale überlagert wird (Romanovsky et al., 1997, Zeisberger, 1999).

Eine neuronale Signalweiterleitung zum ZNS über den *N. vagus* könnte wie folgt aussehen (Blatteis, 2006):

Nach dem Eindringen eines infektiösen Mikroorganismus über Verletzungen der Haut, den Mund-, Rachen- und Nasenraum oder nach experimenteller Injektion von LPS aus gram-negativen Bakterien, kann dieser Stimulus bei nicht ausreichenden, lokalen Abwehrmechanismen in die Blutzirkulation und somit zur Leber gelangen. Dort wird dieser von den Kupffer-Zellen, die sich an der Innenwand der Lebersinusoide befinden, aufgenommen. Diese produzieren daraufhin die Komplementkomponente C5a, die wiederum zur Freisetzung von PGE₂ führt. Dieses stimuliert hepatische vagale Afferenzen, deren Mehrzahl im *Nucleus tractus solitarius* (NTS) der *Medulla oblongata* enden. Vom NTS wird das Signal weiter über noradrenerge Zellbündel zur *Area praoptica* (POA) geleitet und führt über eine lokale Produktion von PGE₂ zu einem schnellen Anstieg der Körperkerntemperatur (Blatteis, 2006).

4. Die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse

Die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (nach der angloamerikanischen Terminologie als „HPA“ abgekürzt) besteht aus dem Hypothalamus, der Hypophyse und der Nebennierenrinde. Sie bilden ein neuroendokrines System, welches zum einen eine essentielle Bedeutung für die Verarbeitung von Stressstimuli hat und zum anderen an vielen physiologischen und pathophysiologischen Zuständen beteiligt ist (Abbildung 4-1). Somit steht dieses neuroendokrine System in einem ständigen Informationsaustausch mit dem Immunsystem (Chrousos, 2009, Ulrich-Lai and Herman, 2009).

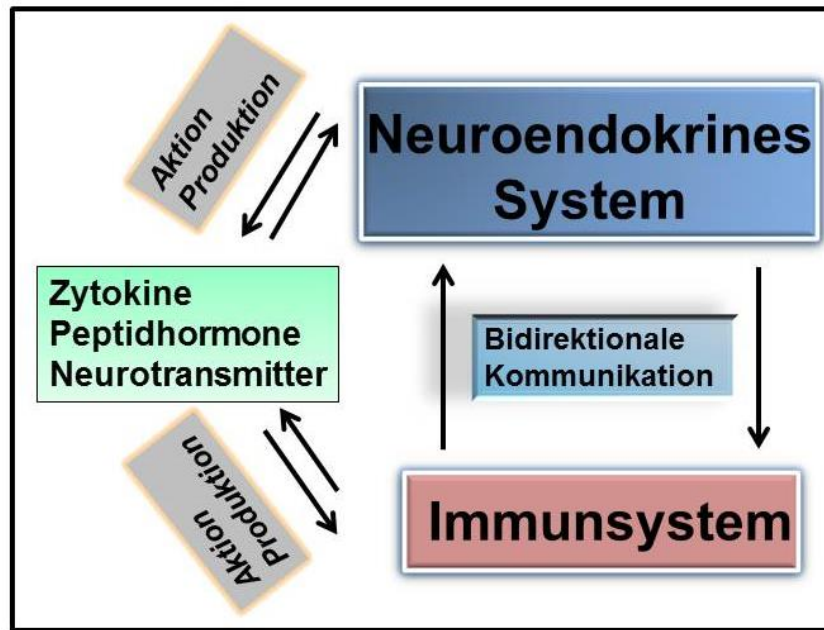


Abbildung 4-1

Schematische Darstellung der Wechselbeziehungen zwischen neuroendokrinem System und Immunsystem.

Das neuroendokrine System und das Immunsystem stehen in einem engen Kontakt zueinander. Damit der Organismus sowohl auf akute als auch auf langfristige Ereignisse adäquat reagieren kann, findet ein ständiger und bidirektionaler Austausch von Informationen statt. Das endokrine System kommuniziert mit dem Immunsystem sowohl direkt als auch indirekt, lokal und global, stimulierend und hemmend. Das bedeutsamste Hormonsystem, welches mit dem Immunsystem interagiert, ist die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HPA-Achse).

Abbildung modifiziert nach (Weigent and Blalock, 1995).

4.1. Anatomischer Aufbau der HPA-Achse

4.1.1. Der Hypothalamus (H)

Der Hypothalamus bildet einen Teil des Zwischenhirns (*Diencephalon*), liegt rostral des Mittelhirns (*Mesencephalon*) und caudoventral des Vorderhirns (*Prosencephalon*). Er wird vom Thalamus (dorsal), der *Lamina terminalis* (rostral) und dem *Corpus mammillare* (caudal) begrenzt und bildet den Boden des III. Ventrikels. Zu seinen Aufgaben zählen die Integration von afferenten Signalen, die adäquate Antwort des Organismus auf Stress und die Regulation vieler komplexer, vor allem vegetativer Funktionen [Wärmeregulation, Wasser- und Elektrolythaushalt, Energiehaushalt, Reproduktion, circadiane Rhythmik etc. (Moore and Eichler, 1972, Stephan and Zucker, 1972, Morton et al., 2006)]. Der Hypothalamus erhält dabei auch Informationen aus den Sinnesorganen, die sich durch die vielen Konnektivitäten dieser Gehirnstruktur auf das vegetative Nervensystem auswirken können. Gefühlsbetonte, psychische Reaktionen sind ebenfalls häufig mit vegetativen Begleiterscheinungen verbunden (Erhöhung der Herzfrequenz und des Blutdrucks, Hemmung bzw. Aktivierung der Magen- und Darmtätigkeit). Solche Signale werden vom limbischen System und höheren Zentren des

Vorderhirns zum Hypothalamus geleitet, dort verarbeitet und resultieren in entsprechenden Änderungen der Funktion von Effektororganen (Gefäße, Herz etc.) (Nickel et al., 1992).

4.1.1.1. Der *Nucleus paraventricularis* (PVN) des Hypothalamus

In der supraoptischen Region des Hypothalamus liegt ein Kerngebiet, welches für die neuroendokrine Funktion des Hypothalamus von besonderem Interesse ist, der *Nucleus paraventricularis* (PVN) (Abbildung 4-2) (Herman and Cullinan, 1997, Herman et al., 2003).

Der PVN ist deshalb von zentraler Bedeutung, weil er Afferenzen von der *Medulla oblongata*, dem limbischen System (z.B. den *Amygdalae*) und anderen hypothalamischen Kernen (*Nucleus arcuatus* (ARC), *Nucleus supraquiasmaticus* (SCN), *Nucleus supraopticus* (SON), *Nucleus ventromedialis* (VMH)) erhält. Wie in Kapitel 4.5 erwähnt, stehen auch das *Organum subfornicale* (SFO) und das *Organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT) mit dem PVN in Verbindung (Silverman et al., 1981).

Mit dem Focus auf der HPA-Achse sind die Efferenzen zur ME und dem Hypophysenvorderlappen (Adenohypophyse, HVL) von enormer Wichtigkeit (Nickel et al., 1992). Morphologisch lassen sich bei dem paarig zu beiden Seiten des III. Ventrikels angelegten PVN ein magnozellularer, ein parvozellulärer und ein parvozellulär, periventrikulärer Bereich unterscheiden. Die magnozellularen Zellen produzieren Oxytocin und Vasopressin, welche über die Fasern des *Tractus supraopticohypophyseus* und den *Tractus paraventriculohypophyseus* in den Hypophysenhinterlappen (Neurohypophyse, HHL) gelangen und dort in Vesikeln gespeichert werden (Brownstein et al., 1980, Landgraf et al., 1990). In den parvozellulären Kompartimenten wird CRH produziert und freigesetzt, welches über den *Tractus tuberohypophyseus* in die ME gelangt und über das Portalvenensystem des Hypophysenstiels die feinen Kapillargeflechte des Vorderlappens erreicht (Nickel et al., 1992). Im HVL bewirkt es die Freisetzung von ACTH, das in die Blutbahn abgegeben wird und an der Nebennierenrinde die Freisetzung von Corticosteron bzw. Cortisol stimuliert (Chrousos, 2009). Diese Steroidhormone wirken wiederum in einem negativen Feedback-Mechanismus und haben hemmenden Einfluss auf die CRH- und ACTH- Produktion (Herman et al., 2012, Myers et al., 2012).

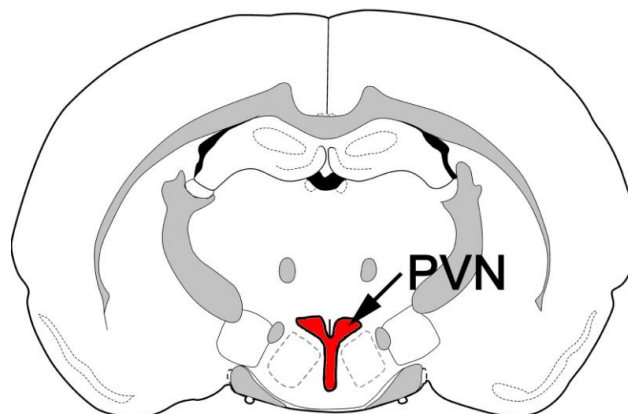


Abbildung 4-2

Schematische Darstellung des *Nucleus paraventricularis* (PVN) im Hypothalamus der Ratte.

Abbildung modifiziert nach (Paxinos and Watson, 1998).

4.1.2. Die Hypophyse (*Glandula pituitaria*)

Die Hypophyse und der Hypothalamus stehen in einer engen Wechselbeziehung, da die Hypophyse eine Schlüsselposition im endokrinen System einnimmt und ihre komplexen Aufgaben nur in enger Zusammenarbeit mit dem Hypothalamus bewerkstelligen kann.

Die Hypophyse ist in das *Diaphragma sellae* der *Dura mater* eingespannt und dadurch fest am Boden der *Sella turcica* bzw. *Fossa hypophysialis* verankert (Abbildung 4-3). Sie besteht aus unterschiedlichen Anteilen, die sich jeweils bei den einzelnen Tierarten und entwicklungsgeschichtlich unterscheiden. Der Hirnteil (*Pars neuralis*) wächst aus dem Boden des Hypothalamus und entwickelt sich zum HHL, der keine Blut-Hirn-Schranke besitzt. Dieser bleibt mit dem Hypothalamus über den Hypophysenstiel (*Infundibulum*) verbunden, der auch die ME enthält. Im HHL befinden sich Pituizyten, Blutgefäße und marklose Nervenfasern, deren Perikaryen im PVN sowie im SON liegen und über den *Tractus hypothalamohypophyseus* in den HHL ziehen (Nickel et al., 1992).

Der Drüsenteil hingegen entsteht aus dem ektodermalen Epithel der Rathkeschen Tasche und entwickelt sich zu einer endokrinen Drüse mit ausgeprägtem Gefäßnetz. Zwischen Vorder- und Hinterlappen befindet sich der Zwischenlappen (*Pars intermedia adenohypophysis*). Die Epithelzellen des HVL bilden Hormone, die die Funktionen anderer Drüsen und Organe regulieren. Dazu gehören das direkt wirkende Hormon Melanotropin (MSH) und das Wachstumshormon Somatotropin (STH). Indirekt wirken dagegen alle glandotropen Hormone: das follikelstimulierende Hormon (FSH), das luteinisierende Hormon (LH), das mammotrope Hormon Prolaktin und das Thyreotropin (TSH). Für die Betrachtung der HPA-Achse in Stresssituationen und während einer Entzündung oder Verletzung ist ACTH von besonderer Bedeutung, da es wie oben erwähnt die Freisetzung von Corticosteron bzw. Cortisol und Sexualhormonen bewirkt (Nickel et al., 1992). Die corticotropen Zellen stellen ungefähr 15-20 % der Zellen des HVL. Die Hypophyse ist nicht nur ein wichtiges Ziel verschiedener Zytokine, sondern auch in der Lage eine breite Palette an Zytokinen selbst zu produzieren (Ray and Melmed, 1997). Ein wichtiges Zytokin ist in diesem Zusammenhang IL-6 (siehe Kapitel 7.4) (Spangelo et al., 1990c), dessen Produktion und Freisetzung maßgeblich durch LPS, IL-1 β und TNF- α gesteigert werden kann (Nash et al., 1992, Spangelo et al., 1994). Die Hauptquellen dieses IL-6 sind in der Hypophyse follikulostellate (FS-) Zellen („follicular stellate cells“), die ca. 10 % der Zellen des HVL ausmachen und durch LPS, IL-1 β , TNF- α (Spangelo et al., 1991) und andere Stoffe wie PACAP („pituitary adenylate cyclase-activating peptide“) und VIP („vasoactive intestinal peptide“) (Spangelo et al., 1990a, Tatsuno et al., 1991) stimuliert werden können. Gehemmt wird die IL-6 Freisetzung durch Glucocorticoide via Rezeptoren auf den FS-Zellen (Ozawa et al., 1999). Das in der Hypophyse selbst synthetisierte und freigesetzte IL-6 könnte den stimulierenden Effekt der im Blutkreislauf zirkulierenden Zytokine verstärken und somit die Aktivierung der HPA-Achse während einer Infektion oder Entzündung unterstützen. Dies könnte insgesamt die Wirkung der im Zuge dieser Signalkaskade gebildeten, antiinflammatorisch wirkenden Glucocorticoide verstärken (Gloddek et al., 2001). Das Zytokin IL-1 konnte beim Menschen bisher nur in Tumorzellen der Hypophyse nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnte bei der Ratte eine IL-1-mRNA-Expression in der Hypophyse identifiziert werden (Koenig et

al., 1990). Des Weiteren wurde auch eine $\text{TNF-}\alpha$ -mRNA-Expression im HVL von Ratten nachgewiesen (Gatti and Bartfai, 1993).

Bei der Untersuchung verschiedener Signalwege und Zusammenhänge und bei der Verwendung von primären Zellkulturen des Hypophysenvorderlappens muss beachtet werden, dass die Anordnung und das Wachstum der Zellen von besonderer Bedeutung sind. Monolayer-Zellkulturen zeigten meist kaum Reaktionen auf die Stimulation mit LPS, Zytokinen oder anderen Mediatoren. Dagegen waren Kulturen in denen sich Zellaggregate geformt und eine dreidimensionale Struktur etabliert hatten, deutlich durch verschiedene Mediatoren stimulierbar (Perez Castro et al., 2001). In einer Monolayer-Kultur konnte durch LPS die Freisetzung von IL-6, aber nicht von Hormonen erreicht werden, was darauf hinweist, dass LPS in diesem Fall direkt stimulierend auf FS-Zellen, aber nicht indirekt stimulierend über IL-6 auf endokrine Zellen wirken kann. Es scheint der dazu nötige Kontakt unter den Zellen zu fehlen. Das freigesetzte IL-6 diffundiert so ausschließlich in den Überstand der Zellkultur ohne die an den corticotropen Zellen nötigen Konzentrationen zu erreichen. In den dreidimensionalen Hypophysenzellkulturen hingegen, stehen die FS-Zellen mit den corticotropen Zellen über ihre Fortsätze in enger Verbindung und so führt die LPS-stimulierte Freisetzung von IL-6 zu einer signifikanten Ausschüttung von Hypophysenhormonen wie beispielsweise ACTH (Gloddek et al., 2001). Voraussetzung für diese parakrine Wirkung ist eine ausreichend hohe Konzentration von IL-6 in den kleinsten Zwischenzellräumen der Hypophyse (Lohrer et al., 2000).

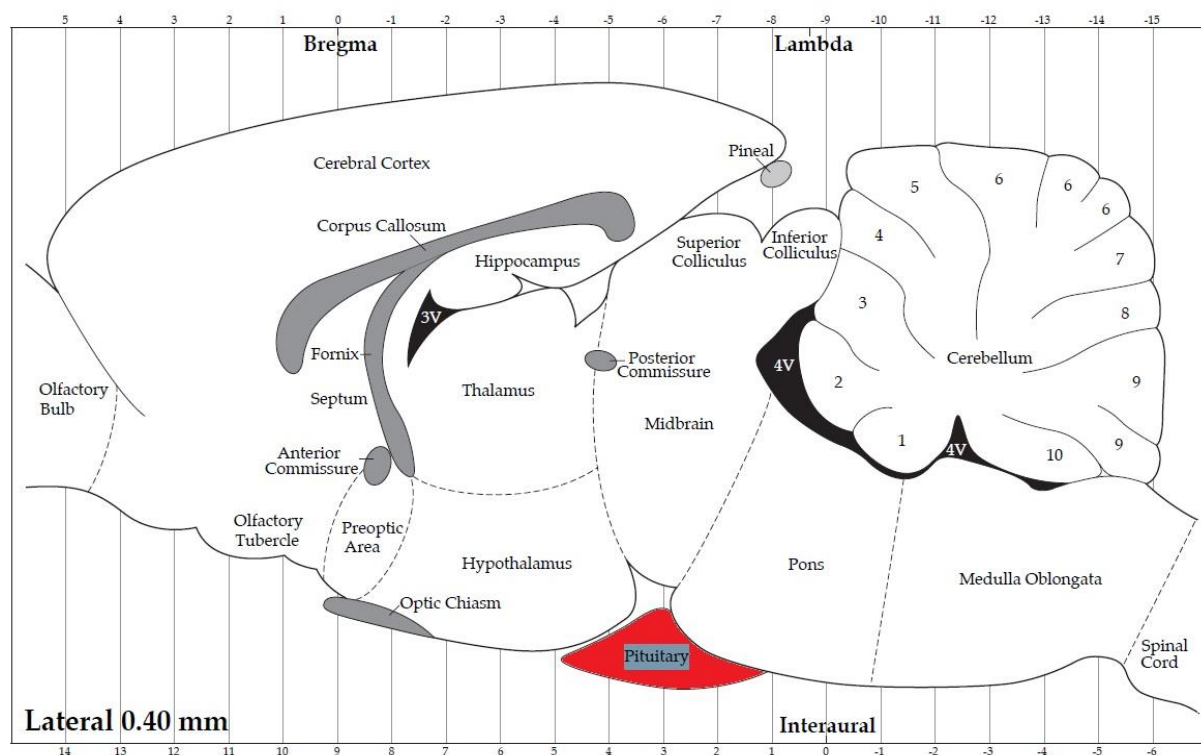


Abbildung 4-3

Schematische Darstellung der Lage der Hypophyse (in Rot) unterhalb des Hypothalamus.

Abbildung modifiziert nach (Paxinos and Watson, 1998).

4.1.2.1.Follikulostellate Zellen des HVL

FS-Zellen wurden 1953 zum ersten Mal von Rinehart und Farquhar beschrieben (Rinehart and Farquhar, 1953) und entstammen aus dem Neuroektoderm. Sie sind sternförmige, agranuläre, nicht-endokrine und S100-Antigen-positive Zellen HVL.

Für die Organisation der parakrinen Kommunikation innerhalb der Hypophyse spielen sie eine herausragende Rolle (Allaerts et al., 1990). Sie formieren sich meist in Gruppen, es existieren aber auch einzelne FS-Zellen im Parenchym. Mit ihren langen Fortsätzen dringen sie in den perivaskulären Raum ein, wodurch ein Netzwerk aus Zellen entsteht, welches zum einen die direkte Interaktion und zum anderen eine Art Langstrecken-Kommunikation über sich fortpflanzende Calcium-Ströme möglich macht (Fauquier et al., 2001). Durch eine Verbindung über „Gap-Junctions“ können die FS-Zellen synchron auf Reize reagieren und sowohl Nährstoffe als auch regulatorische Moleküle mit den hormonproduzierenden Zellen austauschen (Stojilkovic, 2001). Des Weiteren wurde vermutet, dass sie Stammzellen für hormonproduzierende Hypophysenzellen darstellen, was aber nicht weiter bestätigt werden konnte (Inoue et al., 2002). Sie produzieren unter anderem IL-6, Wachstumsfaktoren [Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Fibroblast Growth Faktor (FGF)] und exprimieren Rezeptoren für PACAP und GnRH (Gonadotropin-Releasing-Hormon). Die IL-6-Produktion kann durch LPS via CD14 und TLR4 sowie unter Beteiligung des Transkriptionsfaktors NF κ B direkt stimuliert werden (Lohrer et al., 2000, Arzt, 2001). Im Rahmen eines Entzündungsgeschehens scheinen die FS-Zellen durch die Synthese von IL-6 und die Beeinflussung der ACTH-Produktion in die angemessene Antwort der Hypophyse involviert zu sein. Ob auch andere Zytokine wie beispielsweise TNF- α durch die FS-Zellen produziert werden können, ist bis dato noch nicht geklärt (Abbildung 4-4).

Es muss beachtet werden, dass durch eine LPS-Stimulation die POMC-Expression auch über TLR4, die sich auf den corticotropen Zellen selbst befinden, erhöht werden kann. Allerdings bewirkt dies nur einen Anstieg der ACTH-Produktion selbst, aber nicht eine vermehrte Freisetzung dieses Hormons (Iwasaki et al., 2008).

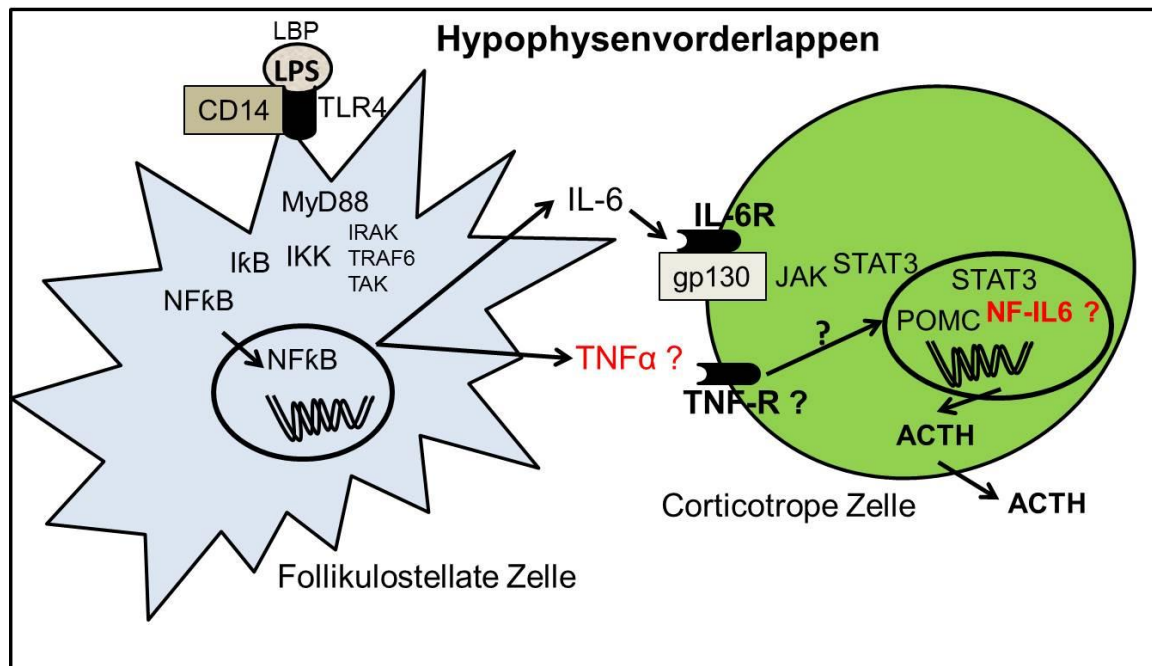


Abbildung 4-4

Schematische Darstellung der Zusammenhänge zwischen der LPS-stimulierten IL-6-Produktion durch follikulostellare Zellen (FS-Zellen) und der ACTH-Bildung und Freisetzung durch corticotrope Zellen im Vorderlappen der Hypophyse.

Nachdem LPS mit seinem Bindungsprotein (LBP) an CD14 und den TLR4 gebunden hat, wird IRAK (Interleukin-1-Rezeptor assoziierte Kinase) über MyD88 („myeloid differentiation primary response protein“) an den Rezeptor gebunden und autophosphoryliert (Martin et al., 1994, Cao et al., 1996). Daraufhin bindet TRAF6 (TNF- α -Rezeptor assoziierter Faktor) an IRAK und der IKK (I κ B-Kinase-Komplex) wird aktiviert. Dieser phosphoryliert I κ B (DiDonato et al., 1997, Mercurio et al., 1997) und NF κ B wird freigesetzt, wandert in den Zellkern und erhöht dort die Transkription des IL-6-Gens.

Das von der FS-Zelle gebildete IL-6 bindet über seinen Rezeptor an der corticotrophen Zelle und bewirkt dort die Dimerisierung des Vermittlerproteins gp130 (Heinrich et al., 1998a) und die Aktivierung von Janus-Kinasen (JAK) durch Autophosphorylierung. Diese wiederum phosphorylieren Tyrosin-Reste des zytoplasmatischen Anteils von gp130 (Lutticken et al., 1994). Daraufhin werden Transkriptionsfaktoren der STAT-Familie (STAT1 und STAT3) durch Phosphorylierung aktiviert und formen Homo- und Heterodimere, bevor sie in den Zellkern einwandern und dort die Transkription des POMC-Gens steigern. Das Prohormon POMC wird in ACTH und weitere Spaltprodukte aufgespalten.

Ob dem Transkriptionsfaktor NF-IL6 eine potenzielle Rolle bei der LPS-induzierten ACTH-Produktion in corticotrophen Zellen zugesprochen werden kann und ob neben IL-6 auch weitere Zytokine (TNF- α) von den follikulostellaten Zellen gebildet werden können, ist bis heute noch nicht ausreichend untersucht.

Abbildung modifiziert nach (Arzt, 2001).

4.2. Das Protein POMC (Proopiomelanocortin)

POMC ist ein Prohormon, welches posttranslational in weitere Hormone gespalten wird. Es wird in der Hypophyse, im Hypothalamus (*Nucleus arcuatus*), in der Medulla (*Tractus solitarius*) und in Zellen der Peripherie (Leber, Nieren, Gonaden und Plazenta) gebildet. Die Expression des POMC-Gens kann durch unterschiedliche Signale initiiert werden. Dazu

gehören hypothalamisches CRH, Zytokine, Katecholamine und VIP. Über Glucocorticoide wird hingegen eine Hemmung der Expression vermittelt. Im HVL wird POMC in ACTH, γ -MSH und β -Lipotropin und im Zwischenlappen in CLIP („corticotropin-like intermediate peptide“), α -MSH, γ -Lipotropin und β -Endorphin gespalten (Papadimitriou and Priftis, 2009) (Abbildung 4-5).

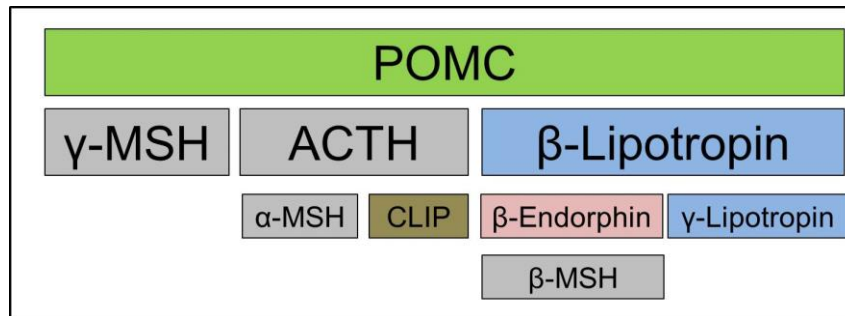


Abbildung 4-5

Schematische Darstellung der Spaltprodukte des Prohormons POMC (Proopiomelanocortin) in γ -MSH (γ -Melanozyten-stimulierendes Hormon), ACTH (Adrenocorticotropes Hormon), β -Lipotropin, α -MSH (α -Melanozyten-stimulierendes Hormon), CLIP („corticotropin-like intermediate peptide“), β -Endorphin, γ -Lipotropin und β -MSH (β -Melanozyten-stimulierendes Hormon).

Abbildung modifiziert nach (Papadimitriou and Priftis, 2009).

4.3. Nebenniere (*Glandula suprarenalis*)

Die Nebenniere ist ein paariges Organ, welches retroperitoneal und craniomedial am vorderen Nierenpol und in enger Nachbarschaft zur *Aorta abdominalis* und *Vena cava caudalis* liegt. Sie steht, obwohl keine funktionelle Beziehung besteht, über Binde- und Fettgewebe und über Gefäße mit der Niere in Verbindung. Des Weiteren wird die außen liegende Rinde vom innen liegenden Mark getrennt. Beide Anteile unterscheiden sich entwicklungsgeschichtlich und funktionell, da das Mark Adrenalin und die Vorstufe Noradrenalin und die Rinde Mineralocorticoide (*Zona glomerulosa*), Glucocorticoide (*Zona fasciculata*) und androgene Corticoide (*Zona reticularis*) bildet (Nickel et al., 1992).

4.4. Die Aktivierung der HPA-Achse (basal und in Stresssituationen)

Der Begriff „Stress“ hat sich in der heutigen Gesellschaft zu einem vielfach verwendeten Wort entwickelt und kann als jeglicher körperlicher Zustand bezeichnet werden, der das zuvor vorhandene körperliche Gleichgewicht (Homöostase) stört (Goldstein and Kopin, 2007).

Die Reaktion auf längerfristige Stresssituationen erfolgt stereotyp und somit immer nach dem gleichen Schema, dem allgemeinen Anpassungssyndrom (AAS).

Dies bedeutet, dass nach Einwirken des Stressors eine Ausschüttung von Katecholaminen („fight or flight“-Antwort) erfolgt, Blutdruck und Herzfrequenz ansteigen und Energiereserven mobilisiert werden. Es folgt eine vermehrte Ausschüttung von ACTH aus dem HVL und die Freisetzung von Corticosteron bzw. Cortisol aus der Nebennierenrinde. Nach dieser Alarmreaktion folgt eine Widerstandsphase bei der das aktuelle Stressniveau

gesenkt werden soll und die zuvor ausgeschütteten Stresshormone abgebaut werden. Kann der auslösende Stressor nicht entfernt und der Körper auf ein „Normalniveau“ zurückgeführt werden, können langfristige Schäden und ein Erschöpfungsstadium entstehen (Selye, 1951). Die HPA-Achse ist allerdings nicht nur während oder aufgrund von Stressreaktionen aktiviert, sondern zeigt während der Ruhephasen des Körpers eine basale Aktivität und typische Sekretionsmuster, die einem circadianen Rhythmus unterliegen. Dieses pulsatil ausgeschüttete Corticosteron bzw. Cortisol ist für die physiologische Funktion vieler Gewebe unentbehrlich. Schon sehr geringe Abweichungen von den in einem gesunden Organismus zirkulierenden Steroidspiegeln, verursacht große Abweichungen physiologischer und biochemischer Parameter (Chrousos, 1995). Der Peak der Steroidhormonkonzentration kann beim Menschen in den frühen Morgenstunden („cortisol awakening response“, CAR) und die geringste Konzentration in den ersten Stunden der Nacht detektiert werden (Wust et al., 2000).

Die große Bedeutung der HPA-Achse für die Aufrechterhaltung der physiologischen Homöostase des Organismus konnte vorwiegend durch Studien an adrenaletomierten Nagern gewonnen werden (Bertini et al., 1988, Kapcala et al., 1995). Da diese Tiere nach einer Injektion von LPS oder Zytokinen wie IL-1 oder TNF- α eine erhöhte bzw. nach Behandlung mit Glucocorticoiden eine reduzierte Sterblichkeitsrate zeigten, konnten außerdem weitere Hinweise auf die immunregulatorische Funktion der HPA-Achse gesammelt werden. So resultierte eine Erhöhung der Glucocorticoid-Konzentration im Blutplasma dieser Tiere auch in erniedrigten IL-1, IL-6 und TNF- α -Spiegeln und führte zu einer Erhöhung antiinflammatorischer Zytokine wie IL-10 (Bertini et al., 1988, Chrousos, 1995). Dies zeigt, dass die HPA-Achse im Rahmen einer Infektion bei der Vermeidung eines septischen Schocks maßgeblich beteiligt und somit auch klinisch von großer Bedeutung ist. Für Patienten mit einer Sepsis ist die adäquate Antwort der HPA-Achse entscheidend, um diese lebensbedrohliche Situation zu überstehen (Vermes et al., 1995, Matot and Sprung, 1998).

Inwieweit sich die Mechanismen der LPS-induzierten und stressinduzierten Aktivierung der HPA-Achse unterscheiden, ist bis dato noch unzureichend geklärt und ist daher auch Untersuchungsgegenstand der vorliegenden Arbeit (Abbildung 4-6).

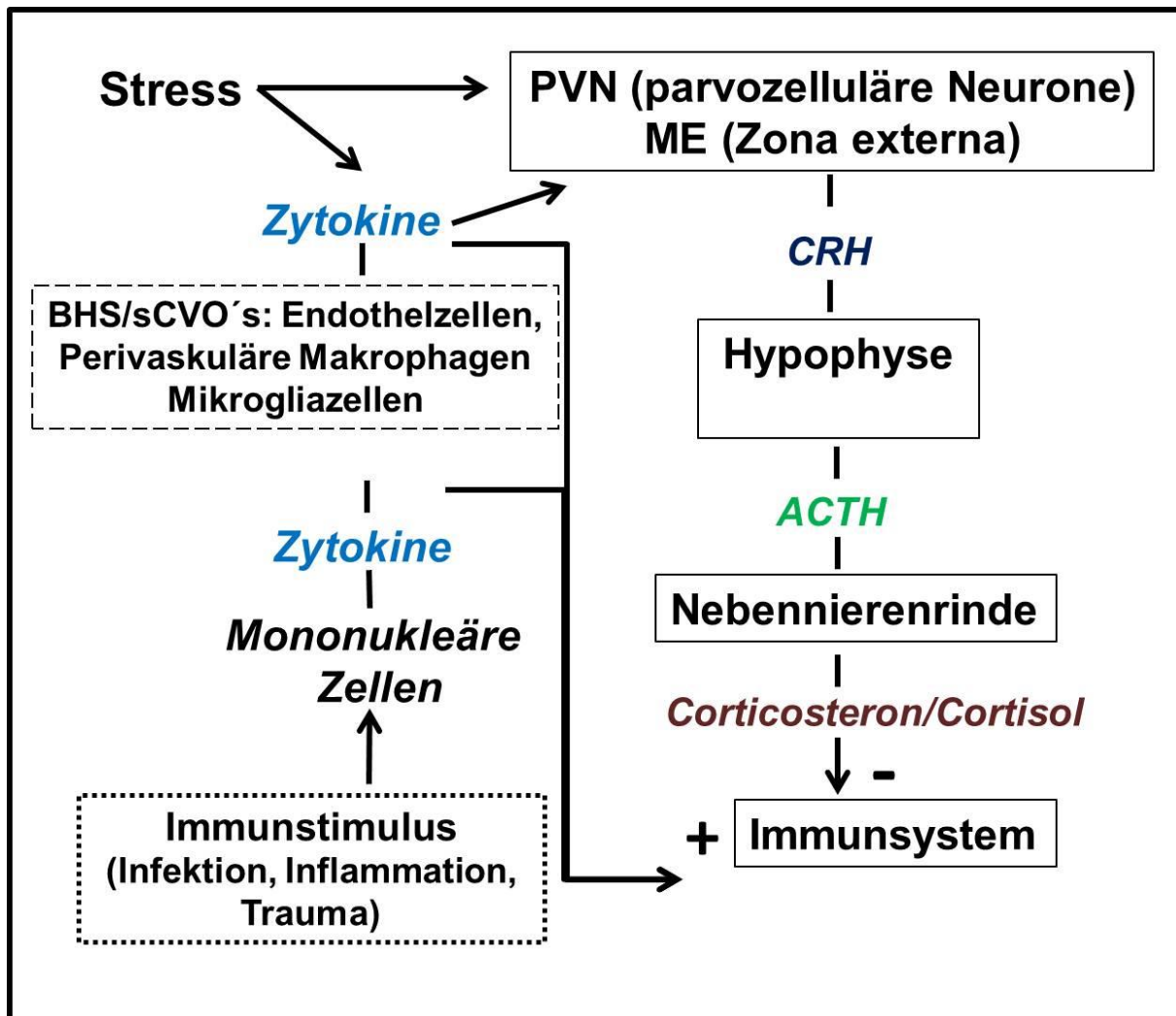


Abbildung 4-6

Schematische Darstellung der Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse durch Stress oder andere Immunstimuli.

Nach dem Auftreten eines stressauslösenden Ereignisses werden die eintreffenden Informationen im Thalamus gefiltert und in höhere Rindenareale verschaltet. In der Hirnrinde wird die Sinneswahrnehmung mit bereits vorhandenen Gedächtnisanteilen verglichen und weiter verarbeitet. Zusätzlich erfolgt eine emotionale Bewertung in den Arealen des limbischen Systems. Falls der eingetroffene Sinneseindruck als bedrohlich oder potenziell schädigend eingestuft wird, erfolgt die Aktivierung der HPA-Achse. Des Weiteren können auch andere periphere Immunstimuli (Infektionen, Inflammationen oder ein Trauma) mit der nachfolgenden Produktion von Zytokinen durch mononukleäre Zellen und der Signalweiterleitung über Zellen an der BHS (Endothelzellen, Gliazellen etc.), die wiederum sekundäre Mediatoren produzieren, zur Aktivierung der Stress-Achse führen. Im Hypothalamus erfolgt dann die Aktivierung von parvozellulären Neuronen des *Nucleus paraventricularis* (PVN). Das Corticotropin-Releasing Hormon (CRH) wird aus Nervenendigungen, die in der *Eminentia mediana* (ME) enden, in das Portalvenensystem der Hypophyse und in dessen Vorderlappen abgegeben, wo es die Freisetzung von ACTH aus corticotropen Zellen stimuliert. Das in die Blutzirkulation entlassene ACTH bewirkt die Ausschüttung von Corticosteron bzw. Cortisol aus der Rinde der Nebenniere.

4.5. Die potenzielle Bedeutung der sCVO's bei der Aktivierung der HPA-Achse

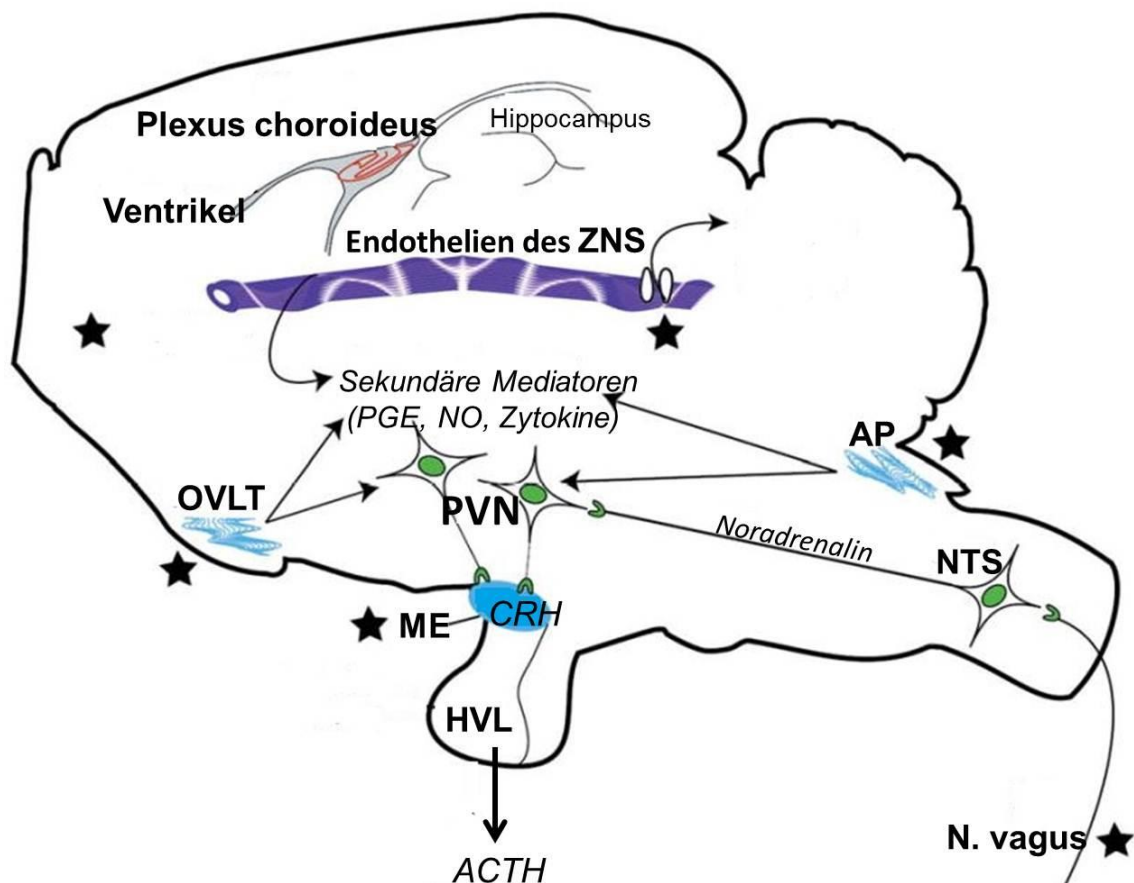


Abbildung 4-7

Schematische Darstellung der möglichen Aktivierungswege von CRH-Neuronen im PVN durch Zytokine.

In der Blutzirkulation befindliche Zytokine können die Produktion von sekundären Mediatoren (PGE_2 , NO, Zytokine) durch Endothelzellen oder Mikrogliazellen stimulieren. Diese sekundären Mediatoren könnten wiederum CRH-Neurone im *Nucleus paraventricularis* (PVN) aktivieren (siehe Kapitel 3.2). Eine weitere Möglichkeit besteht in einem aktiven, sättigbaren Mechanismus durch den Zytokine aus dem Blut in das Gehirnparenchym transportiert werden können. Allerdings ist die so transportierte Menge an Zytokinen sehr gering. Im Bereich der Circumventrikulären Organe (CVO's) besitzt die Blut-Hirn-Schranke (BHS) eine sehr hohe Gefäßdichte und ein fenestriertes Endothel. Zirkulierende Zytokine können hier die neuronale Aktivität der CRH-Neurone erhöhen bzw. die Bildung von sekundären Mediatoren initiieren. Afferenzen des *Nervus vagus* (N. vagus) können durch lokal gebildete Mediatoren (Zytokine, PGE_2) stimuliert werden, wodurch das Signal zum *Nucleus tractus solitarius* (NTS) der Medulla oblongata gelangt. Von dort könnte es über noradrenerge Zellbündel in den Hypothalamus weitergeleitet werden, wo sich im PVN die CRH-Neurone befinden (siehe Kapitel 3.3).

Abbildung modifiziert nach (Silverman et al., 2005).

Da höchstwahrscheinlich die meisten Zytokine die BHS weder durch Diffusion noch über aktive Transportmechanismen in genügender Menge und Geschwindigkeit passieren können, um selbstständig Funktionen von Gehirnzentren zu modifizieren, müssen zusätzliche „Stationen“ der Übermittlung für die Aktivierung der HPA-Achse involviert sein. Auch der

neuronale Signalweg bietet keine vollständige Erklärung für die Weiterleitung peripherer Signale des Immunsystems an das zentrale Nervensystem. Ergänzend sind nämlich die sCVO's und dabei auch katecholaminerge Zellen der Medulla oblongata, die durch zirkulierendes IL-1 β stimuliert werden können, maßgeblich an der Aktivierung an der HPA-Achse beteiligt (Dunn, 1988, Dunn and Berridge, 1990). Die Projektionen der noradrenergen und adrenergen Zellgruppen aus der *Medulla oblongata* und dem *Nucleus tractus solitarius* (NTS) aktivieren im PVN CRH-produzierende, parvozelluläre Zellen und aktivieren so die HPA-Achse (Cunningham and Sawchenko, 1988). Auch die CVO's, namentlich die ME, das SFO, das OVLT und die AP (unmittelbare Nähe zum NTS) haben afferente Projektionen zum PVN des Hypothalamus (Silverman et al., 1981) (Abbildung 4-7).

4.5.1. Die *Eminentia mediana* (ME)

Die an der Basis des Hypothalamus liegende *Eminentia mediana* gilt als eine wichtige Schnittstelle zwischen Immunsystem und endokrinem System (Abbildung 4-7). Efferente Nervenfasern der parvozellulären Zellen des PVN enden in der ME und entlassen nach ihrer Aktivierung durch Zytokine CRH in das Portalvenensystem des HVL (Sharp et al., 1989). Die ME ist somit eine sehr wichtige Struktur, über die zirkulierende Mediatoren die CRH-Sekretion stimulieren können, ohne in direkten Kontakt mit den parvozellulären Zellkörpern des PVN zu treten.

4.5.2. Das *Organum subfornicale* (SFO)

Das SFO, dessen Projektionen den PVN über die *Lamina terminalis* erreichen, scheint in der Aktivierung der HPA-Achse eher eine untergeordnete Rolle zu spielen. Auch nach experimenteller Verletzung des SFO konnten keine Veränderungen in der IL-1 β -induzierten ACTH-Freisetzung festgestellt werden (Katsuura et al., 1990).

4.5.3. Das *Organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT)

Projektionen des OVLT innervieren CRH-produzierende, parvozelluläre Bereiche des PVN (Lin and Lin, 1996, Elmquist et al., 1997b) (Abbildung 4-7), allerdings ist die Rolle des OVLT in der Aktivierung der HPA-Achse bis heute widersprüchlich (Buller, 2001). Studien zur c-fos-Expression, ein „immediate early gene“ (Elmquist et al., 1996), dessen Expression als Aktivitätsmarker vorwiegend für Neurone verwendet wird, zeigten eine deutliche Aktivierung in Zellen des OVLT nach systemischer LPS oder IL-1 β -Gabe. Allerdings wurde auch gezeigt, dass die chirurgische Unterbrechung der vom OVLT zum PVN ziehenden Axone keinerlei hemmenden Einfluss auf die CRH-Freisetzung nach systemischer Stimulation mit IL-1 β hatte (Ericsson et al., 1994a). Somit lässt sich zumindest auf eine potenzielle Rolle des OVLT bei der Signalübertragung peripherer Signale an das ZNS via Zytokine schließen, allerdings ohne dessen genaue Bedeutung in der HPA-Achsen-Aktivierung einordnen zu können.

4.5.4. Die *Area postrema* (AP)

Im Gegensatz zur geringen Beteiligung des SFO und des OVLT in der HPA-Achsen-Aktivierung nach systemischer Zytokin-Applikation, scheint die AP aufgrund ihrer privilegierten Lage im dorsalen Vagus-Komplex und der Verbindung zu den oben erwähnten katecholaminergen Zellen der *Medulla oblongata*, für die Signalweiterleitung zum PVN des Hypothalamus von entscheidender Bedeutung zu sein (Buller, 2001) (Abbildung 4-7). Die Signalweiterleitung an den Hypothalamus erfolgt dabei über einen indirekten Weg, indem das Signal einen Umweg über das OVLT zu den katecholaminergen Zellen der *Medulla* und des NTS macht. Von dort wird das Signal an den PVN weitergeleitet, was schließlich eine CRH-Ausschüttung und die Bildung von ACTH im HVL zur Folge hat (Shapiro and Miselis, 1985, Cunningham et al., 1994). Zusätzlich reichen Gefäße der AP bis in den NTS hinein, wodurch für systemisch applizierte Zytokine ein möglicher Weg zur Beeinflussung der katecholaminergen Zellen zur Verfügung steht (Gross et al., 1990). Ein weiterer Hinweis auf eine mögliche Beteiligung der AP an der HPA-Achsen-Aktivierung ist das Vorhandensein von IL-1-Rezeptoren, die allerdings auch in den anderen Circumventrikulären Organen vorkommen (Ericsson et al., 1994b).

5. Transkriptionsfaktoren

Transkriptionsfaktoren sind Proteine, die prinzipiell für die Initiation, aber auch für die Elongation bzw. Termination der Genexpression von großer Bedeutung sind und dadurch auch die genomische Aktivierung von Zellen durch bestimmte Mediatoren vermitteln können. Man unterscheidet prinzipiell zwischen allgemeinen (basalen) und genspezifischen Transkriptionsfaktoren. Für die vorliegende Arbeit sind NF-IL6 („nuclear factor IL-6“), NFκB („nuclear factor kappa B“) und STAT3 („signal transducer and activator of transcription“) von spezieller Bedeutung. Sie spielen bei Entzündungsreaktionen mit Fieber eine wichtige Rolle (Akira, 1997, Nadjar et al., 2003, Damm et al., 2011) und können sogar miteinander interagieren („cross talk“). Diese Fähigkeit eröffnet im Zusammenspiel weitere synergistische oder antagonistische Wirkungen, so dass dadurch Genprodukte hergestellt werden können für deren Promotoren der einzelne Transkriptionsfaktor keine Bindungsstelle besitzt (Agrawal et al., 2003). Nachdem die Transkriptionsfaktoren durch primäre (LPS, TNF-α, IL-1β oder IL-6) oder sekundäre Mediatoren (Zytokine, NO, PGE₂) aktiviert wurden, bewegen sie sich in kürzester Zeit in den Nukleus der Zelle (Nadjar et al., 2005, Rummel et al., 2006), binden an regulatorische Elemente („DNA-Erkennungsstellen“) von Promotoren oder Enhancern und bewirken so die Initiation der Transkription (Levy et al., 1988, Schindler et al., 1992). Die zum Beispiel mittels Immunhistochemie gut darstellbare Akkumulation von bestimmten Transkriptionsfaktoren im Zellkern gilt als Marker für eine stattgefundene genomische Zellaktivierung, die wiederum zu einer charakteristischen Expression von Genen führt (Rummel et al., 2004). Die Erhöhung der Genexpression kann mit auftretenden Krankheitssymptomen korrelieren und dadurch wichtige Hinweise auf die Ursache dieser Symptome geben. Die Kontrolle der Aktionen von Transkriptionsfaktoren könnte Ansätze für die Therapie solcher Symptome bieten. Im Rahmen der Untersuchung von zentralnervös kontrollierten Krankheitssymptomen und der Aktivierung der HPA-Achse in der vorliegenden

Arbeit sind die oben erwähnten Transkriptionsfaktoren NF-IL6, NF κ B und STAT3 von besonderem Interesse und werden daher im Folgenden näher beschrieben.

5.1. NF κ B

Der Name des Transkriptionsfaktors NF κ B lässt sich auf seine erste Beschreibung im Zellkern reifer B-Lymphozyten im Jahre 1986 zurückführen. Man hatte festgestellt, dass dieses Protein an einen bestimmten Bereich des Gens für die κ -Kette der Immunglobuline bindet (Sen and Baltimore, 1986).

NF κ B ist ein Mitglied der Transkriptionsfaktorfamilie Rel. Diese Transkriptionsfaktoren sind in der Lage nach entsprechender Aktivierung als Homo- oder Heterodimer in den Kern der Zelle einzuwandern, um die Transkription von Zielgenen zu regulieren (Ghosh and Karin, 2002). Heute weiß man, dass NF κ B zum einen an der Regulation vieler an der Reaktion des Immunsystems beteiligter Gene (TNF- α , IL-6, IL-12, IL-1 β) und zum anderen auch an der Regulation entscheidender Prozesse wie Wachstum und Differenzierung der Zelle und dem Ablauf des programmierten Zelltods (Apoptose) beteiligt ist (Kielian, 2006).

NF κ B liegt funktionsbereit aber inaktiv und meist als Dimer aus den Untereinheiten p50 (50 kDa; NF κ B1) und p65 (65 kDa; RelA) im Zytosol von ruhenden Zellen vor. Dadurch besteht ohne Aktivierung zunächst kein Berührungspunkt mit der im Zellkern liegenden DNA. Dies wird permanent durch eine Komplexbildung mit I κ B (Inhibitor of κ B) Proteinen gewährleistet, die die nukleäre Translokation und somit den Beginn der Genexpression verhindern (Baeuerle and Baltimore, 1996). Diese Deaktivierung von NF κ B wird erst aufgehoben, wenn zum Beispiel ein PAMP (LPS mit seinem LPS-Bindungsprotein und CD14) an den TLR4 oder ein proinflammatorisches Zytokin wie IL-1 β an den IL-1R1 bindet. Dann kommt es zunächst zu einer Autophosphorylierung der Ser/Thr Kinase IRAK (Interleukin-1-Rezeptor assoziierte Kinase), die zuvor über eine Vermittlung von MyD88 („myeloid differentiation primary response protein“) an den entsprechenden Rezeptor gebunden hat (Martin et al., 1994, Cao et al., 1996, Wesche et al., 1997). Daraufhin bindet der TNF- α -Rezeptor assoziierte Faktor 6 (TRAF6) an IRAK und es folgt die Aktivierung des I κ B-Kinase-Komplexes (inhibitorischer Faktor κ B-Kinase) durch Phosphorylierung (Cao et al., 1996). Dieser phosphoryliert den I κ B, der sich nach Ubiquitinierung vom Dimer (p50/p65) ablöst und im Proteasom abgebaut wird (DiDonato et al., 1997, Mercurio et al., 1997). Die somit freien NF- κ B-Homo-oder Heterodimere können nun in den Zellkern einwandern, an regulatorische Elemente („ κ B enhancer elements“) binden und somit die Genexpression ihrer Zielgene beeinflussen (Baeuerle and Henkel, 1994, Siebenlist et al., 1994) (Abbildung 7-1).

Des Weiteren ist bekannt, dass NF κ B für die physiologische Reaktion der HPA-Achse auf Stressstimuli eine wichtige Rolle spielt, da es durch das Cortisol bzw. Corticosteron, welches am Ende der Stressreaktion ausgeschüttet wird, gehemmt wird (negativer Feedback-Mechanismus). Man geht von einer direkten Interaktion von Cortisol bzw. Corticosteron und der p50 bzw. p65 Untereinheit aus (Scheinman et al., 1995), so dass die Initiation der Expression der Zielgene dadurch verhindert wird, dass NF κ B nicht mehr an die DNA binden kann (Mukaida et al., 1994, Ray and Prefontaine, 1994).

5.2. STAT3

STAT3 steht für “signal transducer and activator of transcription 3“ und ist Mitglied der STAT-Familie, zu der bis heute sieben verschiedene Proteine gehören (STAT1, 2, 3, 4, 5a, 5b, 6). Das 90 kDA schwere STAT3-Molekül ist das am häufigsten aktivierte (Bhattacharya and Schindler, 2003) und auch das einzige Mitglied der STAT-Familie, ohne das ein Säugetierorganismus nicht lebensfähig ist (Takeda et al., 1997). Die Mitglieder der STAT-Familie wurden 1994 bei der Untersuchung von Interferon-Rezeptoren und der Signalweiterleitung über den JAK-STAT-Signalweg entdeckt (Darnell et al., 1994). Im Allgemeinen scheint es unter Ruhebedingungen einen permanenten Austausch nichtphosphorylierter STAT-Moleküle zwischen Zytoplasma und Zellkern zu geben. Wobei in ruhenden, nicht aktivierten Zellen die nicht phosphorylierten STAT-Moleküle vorwiegend im Zytoplasma (Bhattacharya and Schindler, 2003) und nur wenige im Kern zu finden sind (Meyer et al., 2002). STAT3 wird unter anderem durch verschiedene Zytokine der IL-6-, IL-10- und IFN-Familie (Kisseleva et al., 2002), Leptin, den Epidermalen Wachstumsfaktor (EGF), den Granulozyten-Kolonie stimulierenden Faktor (G-CSF), das „bone morphogenetic protein-2“ (BMP-2) und den Hepatozyten-Wachstumsfaktor (HGF/SF) in verschiedenen Zelltypen aktiviert (Heinrich et al., 1998a). Für die vorliegende Arbeit war besonders der durch IL-6 induzierte Signalweg von Bedeutung und soll hier deshalb näher beschrieben werden:

Wenn das proinflammatorische Zytokin IL-6 an seinen membrangebundenen Rezeptor (IL-6-R) bindet, dimerisieren zwei gp130 Untereinheiten und es kommt zur Autotyrosinphosphorylierung der rezeptorassoziierten Janus Kinasen (JAK) (Lutticken et al., 1994). Diese Kinasen phosphorylieren daraufhin ihrerseits die gp130 Untereinheiten, an welche sich dann die STAT3-Moleküle anlagern, die ebenso phosphoryliert werden. Die somit aktiven STAT3-Monomere lagern sich zusammen und wandern als Homo- (STAT3/STAT3) oder Heterodimere (STAT3/STAT1) in den Zellkern ein (Heinrich et al., 1998a, Caldenhoven et al., 1999). Dort reguliert STAT3 durch Bindung an spezifische DNA-Sequenzen („responsive-elements“) die entsprechenden Zielgene (Gruol and Nelson, 1997, Heinrich et al., 1998a, Takeda and Akira, 2000) (Abbildung 7-3). Zu diesen Zielgenen gehören Akute-Phase-Proteine und weitere Transkriptionsfaktoren. Zusätzlich spielt STAT3 auch bei zellulären Prozessen wie Zellwachstum- und Differenzierung sowie Apoptose eine wichtige Rolle. Damit die durch IL-6 initiierte Signalkaskade auch wieder beendet werden kann, findet zum einen der Rückzug des Rezeptorkomplexes in das Zellinnere statt und zum anderen die Entfernung der aktivierenden Phosphorylierungen durch Phosphatasen. Ein negativer Regulator der STAT3-Aktivierung durch IL-6 oder IFN γ ist SOCS3 („suppressor of cytokine signaling 3“) (Krebs and Hilton, 2001), welcher auch als Indikator der STAT3 Aktivität verwendet werden kann (Lebel et al., 2000, Rummel et al., 2008). Die Inhibition wird durch einen negativen Feedback-Mechanismus und Hemmung der JAK's gewährleistet (Sasaki et al., 1999) STAT3 aktiviert diesen Mechanismus selbst, indem er die Expression von SOCS3 erhöht (Hanada and Yoshimura, 2002). Sogenannte PIAS („protein inhibitors of activated STAT“) sind auch an der Aufhebung der STAT3-Signalkaskade beteiligt, indem sie

an zuvor aktivierte STAT3 Monomere binden und die Translokation in den Zellkern abwenden. Auch SOCS3 ist für die vorliegende Arbeit von Bedeutung, da dieser in der Lage ist die Zytokin-initiierte Bildung von POMC und Freisetzung von ACTH zu hemmen (Papadimitriou and Priftis, 2009).

5.3. NF-IL6

5.3.1. Grundlagen

NF-IL6 ist ein Aktivitätsmarker für langfristige und/oder chronische Entzündungsreaktionen im Gehirn (Damm et al., 2011). Er gehört zur „bZIP“-Transkriptionsfaktor-Superfamilie, die durch eine helikale, basische, DNA-bindende Region („basic region, b“) und eine α -Helix-Dimerisierungsdomäne „ZIP“ (Leucin-Zipper) gekennzeichnet ist (Landschulz et al., 1988, Akira et al., 1990, Poli et al., 1990, Ramji and Foka, 2002). NF-IL6 ist somit auch Mitglied der „CCAAT-enhancer-binding protein family“ (C/EBP), die mit dem CCAAT-Box-Motiv der DNA vieler Gene interagieren können und wird auch als C/EBP β bezeichnet. Bisher sind mehrere Mitglieder bekannt: C/EBP α , β , γ , δ , ϵ und ζ (Ramji and Foka, 2002). NF-IL6 wird in vielen verschiedenen Geweben exprimiert: Zellen der Leber, der Lunge, der Milz, der Niere, der Plazenta, der Mamma, des Gastrointestinaltraktes und des Fettgewebes, aber auch in Monozyten und Makophagen (McKnight et al., 1989). Allgemein spielt die Familie der Transkriptionsfaktoren „bZIP“ eine Rolle bei Zellproliferationen- und Differenzierung, Entzündungsreaktionen und bei der Ausbildung des Langzeitgedächtnisses im Hippocampus („long-term memory consolidation“). Prinzipiell werden NF-IL6 in diesem Zusammenhang auch proliferationsfördernde Eigenschaften zugesprochen, was den Verdacht begründet, dass er eine Tumorgenese begünstigen könnte (Buck et al., 1999, Buck et al., 2001). Dagegen sprechen wiederum Beobachtungen, die auf eine Rolle von NF-IL6 in der Suppression von Tumoren hinweisen (Duprez et al., 2003). Den Namen NF-IL6 erhielt dieser Transkriptionsfaktor dadurch, dass er zunächst als ein an die DNA-bindendes Protein beschrieben wurde, welches für die IL-1-induzierte Genexpression von IL-6 verantwortlich war (Isshiki et al., 1990). Auch von einer anderen Gruppe wurde im Jahre 1990 ein Zusammenhang zwischen NF-IL6 und der Regulation der IL-1- und IL-6-Expression festgestellt (Akira et al., 1990, Poli et al., 1990). Für IL-1 β konnte die NF-IL6-Bindungsstelle am Promotor identifiziert werden (Nishizawa and Nagata, 1990). Weitere Bindungsstellen existieren sowohl für NF-IL6 als auch für NF κ B auf dem Cyclooxygenase (COX)-2-Promotor (Kosaka et al., 1994), was die essentielle Rolle von NF-IL6 für die COX-2-Produktion untermauert. Ebenso wichtig scheint NF-IL6 für die Expression der mikrosomalen Prostaglandin-E-Synthase (mPGES) zu sein (Uematsu et al., 2002), so dass NF-IL6 über die Regulation der beiden geschwindigkeitsbestimmenden Enzyme der PGE₂-Produktion (COX-2 und mPGES), Einfluss auf die Menge dieses sehr wichtigen Entzündungsmediators nehmen könnte. Weitere Zielgene von NF-IL6 sind Akute-Phase-Proteine, weitere Zytokine (TNF- α , IL-6) und inflammatorisch bedeutsame Enzyme (iNOS, induzierbare NO-Synthase) und Rezeptoren (TLR1, TLR2, CD14), sowie wichtige inhibitorische Proteine wie SOCS3.

Die NF-IL6-Aktivität und Expression im Zusammenhang mit Entzündungsreaktionen haben in der vorliegenden Arbeit einen besonderen Stellenwert, weshalb erwähnt werden sollte, dass vor allem infektiöse Stimuli wie LPS, TNF- α , IL-1 β und IL-6 z. B. eine Expressionssteigerung von NF-IL6 hervorrufen können, was über die Rezeptoren TLR4 (Lu et al., 2009), TNFR-1 (Yin et al., 1996), IL-1R-1 (Giltaiy et al., 2005) und IL-6R (Akira, 1997) vermittelt werden kann.

5.3.2. Weitere Bezeichnungen für NF-IL6

Abkürzung	Name	Referenz
IL-6-DBP	„IL-6-dependent DNA-binding protein“	(Poli et al., 1990)
AGP/EBP	„ α_1 -acid glycoprotein enhancer binding protein“	(Chang et al., 1990)
CRP2	“C/EBP related protein 2”	(Williams et al., 1995)
NF-M	“nuclear factor-myeloid”	(Katz et al., 1993)
LIP	“liver-enriched inhibitory protein”	(Descombes and Schibler, 1991)
LAP	“liver-enriched activating protein”	(Descombes et al., 1990)

Tabelle 5-1

Synonyme für den Transkriptionsfaktor NF-IL6.

Es gibt drei verschiedene Unterformen von NF-IL6, die sich anhand ihrer Proteingröße unterscheiden: LAP* („liver-enriched activating protein“, 38 kDa), LAP (35 kDa) und LIP („liver-enriched inhibitory protein“, 20 kDa). LIP ist die kürzeste Form und da ihr die Aktivierungsdomäne fehlt, wirkt sie inhibierend und hemmt die Transkription von Zielgenen als Homo- oder Heterodimer (Descombes and Schibler, 1991, Ramji and Foka, 2002). Die drei Isoformen entstehen sowohl durch das sog. „leaky ribosomal scanning“ (LRS) als auch durch eine regulierte Proteolyse (Descombes and Schibler, 1991, Welm et al., 1999). Durch diese Unterformen könnte sowohl eine proinflammatorische Wirkung von NF-IL6 über LAP* und LAP als auch eine antiinflammatorische Wirkung über LIP vermittelt werden.

5.3.3. Struktur

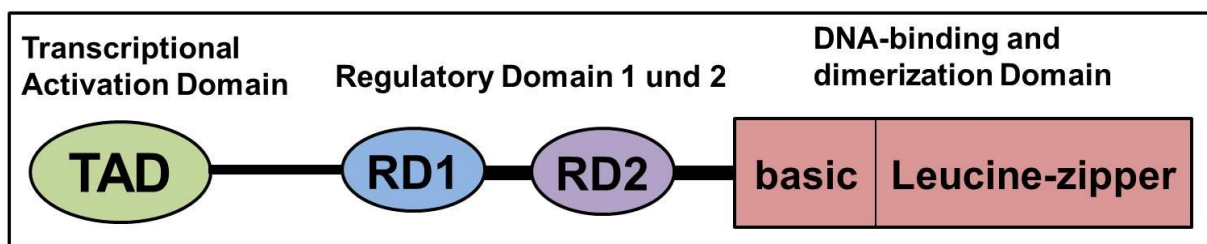


Abbildung 5-1

Schematische Darstellung der Struktur des Transkriptionsfaktors NF-IL6.

Am N-Terminus des C/EBP β -Proteins befindet sich die Domäne „TAD“ („transcription activation domain“) zur Kontrolle der transkriptionalen Antwort. Darauf folgen zwei zentrale regulatorische Domänen „RD1“ und „RD2“. Am C-Terminus liegt die basische DNA-Bindungs- und Dimerisierungsdomäne (bZIP-Domäne). Modifiziert nach (Li et al., 2007).

5.3.4. Funktion

Nur Dimere aus „bZIP“-Transkriptionsfaktoren binden an palindromische DNA-Sequenzen und können somit die Transkription von Zielgenen beeinflussen. Die Dimere formen eine Art Schere bei der jede der beiden Seiten durch eine „basic region“ gebildet wird. (Landschulz et al., 1988, Kouzarides and Ziff, 1989, Turner and Tjian, 1989, Descombes and Schibler, 1991, Hurst, 1995). Es sind auch Homo- und Heterodimere innerhalb und außerhalb der Familie möglich, wodurch die Aktivität und die Funktion von NF-IL6 verändert werden kann.

Man geht davon aus, dass ein peripherer Stimulus wie z. B. LPS vorwiegend eine *de novo*-Synthese von NF-IL6 bewirkt und mittels Phosphorylierung die Aktivität des Transkriptionsfaktors insgesamt gesteigert wird (Damm, 2012). Die neu gebildeten NF-IL6-Proteine wandern in den Zellkern ein, akkumulieren und fördern die Genexpression ihrer Zielgene. Wie viele (wenige) NF-IL6-Moleküle bereits im Zytoplasma der ruhenden Zelle vorliegen, konnte noch nicht abschließend geklärt werden.

5.3.5. Regulation der NF-IL6-Aktivität und Signalwege

Generell wird die Aktivität von NF-IL6 über posttranskriptionale Modifikationen (Phosphorylierung durch Proteinkinasen) sowohl steigend als auch hemmend geregelt.

Eine Steigerung der Aktivität erfolgt beispielsweise über die Phosphorylierung durch MAP-Kinasen (ERK-1 oder ERK-2) im Zellkern (Nakajima et al., 1993) oder durch p90 RSK („ribosomal S6 kinase“), die wiederum von ERK-1 und -2 über eine Phosphorylierung aktiviert werden kann (Buck et al., 1999, Cieslik et al., 2005). Dies könnte bedeuten, dass durch die Aktivierung der MAPK-Kaskade am IL-6-Rezeptor eine Seite an Seite-Aktivierung von NF-IL6 durch ERK-1 und -2 und p90 RSK 1 und 2 erfolgen könnte (Abbildung 7-3). In bestimmten Fällen müssen für die Aktivierung von NF-IL6 auch andere Transkriptionsfaktoren aktiv sein. Bei der IL-6-vermittelten NF-IL6-Aktivierung während der APR in der Leber ist beispielsweise STAT3 an der DNA-Bindung („tethering“) beteiligt (Niehof et al., 2001). Auch andere STAT-Proteine können mit Mitgliedern der C/EBP-Familie interagieren, im Zusammenspiel an die Zielgenpromotoren binden und die Expression dieser Gene beeinflussen (Foka et al., 2001). Überdies werden posttranskriptionale Modifikationen über die Proteinkinasen A, C und G vermutet (Pelletier et al., 1998). Nicht nur die oben genannten inflammatorischen Stimuli wie LPS oder Zytokine, sondern auch neuronale Aktivitäten und hypoxische Zustände können zu einer Aktivierung von NF-IL6 führen (Semenza, 2000, Sun et al., 2007). Ob mögliche Aktivierungswege von NF-IL6 eine potenzielle Rolle in der LPS-induzierten Aktivierung der HPA-Achse spielen könnten, wurde in der vorliegenden Arbeit auch mit Hilfe des JAK-STAT-Inhibitors AG490 (N-Benzyl-3,4-dihydroxybenzylidenecyanoacetamide) in einer Zellkultur des HVL untersucht. Dieser Inhibitor kann die JAK-2-Aktivierung und somit die Tyrosin-Phosphorylierung von STAT3 an den gp130-Rezeptoren verhindern (Xuan et al., 2001, Sriram et al., 2004, Liao et al., 2009,

Lau et al., 2012). Damit ist auch die Unterdrückung von potenziellen, JAK-2-vermittelten Signalwegen der NF-IL6 Aktivierung durch AG490 möglich.

5.3.6. „Cross-Talk“ mit anderen Transkriptionsfaktoren

Das Zusammenwirken von anderen Transkriptionsfaktoren mit NF-IL6 kann synergistische und antagonistische Effekte auf die Expression des entsprechenden Zielgenes haben. Bisher sind Interaktionen mit NF κ B, STAT3, CREB („cAMP responsive element binding protein“), AP („activator protein“-1 bzw. AP-2 bekannt. Ob nun synergistische oder antagonistische Wirkungen entfaltet werden, hängt maßgeblich von der Promotorstruktur des Zielgenes ab (Akira et al., 1990, Chang et al., 1990, Descombes et al., 1990, Poli et al., 1990). In diesem Zusammenhang wurden bereits bei diversen inflammatorischen Genen Bindungsstellen sowohl für NF-IL6 als auch für NF κ B gefunden (LeClair et al., 1992). Man geht davon aus, dass NF κ B, STAT3 und NF-IL6 zeitlich aufeinander aufbauend agieren, die gleichen Gene aktivieren und somit zusammen an der Entstehung von Fieber und dem „sickness behavior“ beteiligt sind (Damm, 2012). Durch das frühe Auftreten der erst genannten Transkriptionsfaktoren, vermutet man eine einleitende Wirkung bei der Fieberentwicklung, wohingegen für NF-IL6 eher eine erhaltende bzw. abschließende Wirkung sowie eine Rolle in der späten APR angenommen werden (Damm et al., 2011). NF κ B ist mit einem Peak der Aktivierung 1-2 h (Nadjar et al., 2003) und STAT3 3-4 h (Harré et al., 2002, Rummel et al., 2005) nach LPS-Stimulation immunhistochemisch detektierbar, worauf NF-IL6 erst nach 6-8 h (Damm et al., 2011) folgt. In vorausgegangenen Studien wurde bereits eine gemeinsame Aktivierung der Transkription von IL-6 durch NF κ B und NF-IL6 festgestellt (Billack et al., 2002) und die Bedeutung von STAT3 für die NF-IL6-Transkription entdeckt (Niehof et al., 2001). Des Weiteren kann NF-IL6 über eine Hemmung mit I κ B α die Aktivität von NF κ B beeinflussen (Cappello et al., 2009). Ob ein Zusammenspiel und somit ein „cross talk“ von NF-IL6 mit NF κ B bzw. STAT3 auch im Zusammenhang mit einer HPA-Achsen-Aktivierung durch LPS stattfindet, ist bis dato nicht bekannt und wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht.

5.3.7. Besonderheiten von NF-IL6-Knock-out-Mäusen

NF-IL6-Knock-out-Mäuse (siehe Kapitel 7.1.4) zeigen aufgrund der Abwesenheit von NF-IL6 in weißem und braunem Fettgewebe (BAT= „brown adipose tissue“) eine verringerte Fettakkumulation und somit eine Intoleranz was Kälteeinwirkungen betrifft (Millward et al., 2007, Schroeder-Gloeckler et al., 2007, Staiger et al., 2009, Motyl et al., 2011). Die Umgebungstemperatur in Haltungen sollte deshalb 30°C nicht unterschreiten (Akira et al., 1990, Descombes et al., 1990, Poli et al., 1990). Des Weiteren führen Defekte sowohl in der Glykogenolyse als auch im Glukose- und Fettstoffwechsel zu einer erhöhten neonatalen Sterblichkeit (Croniger et al., 2001). In neutrophilen Granulozyten dieser Mäuse ist die Expression von IL-6, IL-10 und IL-12 nach LPS-Gabe reduziert, was vermuten lässt, dass NF-IL6 an der Expression dieser Zielgene beteiligt ist und womöglich eine Bindungsstelle am Promotor besitzt (Akagi et al., 2008). Ähnliches konnte für IL-1 β in primären, glialen Zellkulturen nachgewiesen werden, da nach LPS-Stimulation der Zellen die Expression dieses

Zytokins stark vermindert war (Cortes-Canteli et al., 2008). Bei der Zucht von NF-IL6-Knock-out-Mäusen muss bedacht werden, dass die Weibchen steril sind, da NF-IL6 die Entwicklung der Eierstöcke entscheidend beeinflusst (Screpanti et al., 1995, Tanaka et al., 1995, Sterneck et al., 1997).

Des Weiteren sind die Tiere allgemein vor Adipositas und einer Fettleber durch eine verminderte hepatische Expression von lipogenen Genen geschützt (Millward et al., 2007). Zusätzlich liegt eine unvollständige oder fehlerhafte Differenzierung von Hepatozyten (Diehl, 1998), Adipozyten (Darlington et al., 1998) und Neuronen (Taubenfeld et al., 2001) vor. Durch eine erhöhte Tumorzinzidenz und erhöhte IL-6-Konzentrationen im Blut kann es ab einem Alter von 16 Wochen zu Splenomegalie, peripherer Lymphadenopathie, Plasmozytose und extramedullärer Hämatopoese kommen (Screpanti et al., 1995). Dies hat auch eine Störung in der Fähigkeit intrazelluläre Mikroorganismen zu bekämpfen sowie Immundefekte (T-Helferzellen (TH1)-Immundefizienz, fehlerhafte Zytokinsynthese) zur Folge, was die Anfälligkeit für Infektionen mit *C. albicans*, *L. monocytogenes* und *S. typhimurium* deutlich erhöht (Screpanti et al., 1995, Tanaka et al., 1995, Poli, 1998).

Weiterhin besteht bei älteren Tieren eine lympho- und myeloproliferative Störung wie bei IL-6 überexprimierenden Mäusen („Castleman’s disease“) (Screpanti et al., 1995).

5.4. Das anatomische Verteilungsmuster von LPS-induzierten NF-IL6-Signalen sowie Phänotypen reagierender Zellpopulationen im Gehirn

Im Hippocampus liegt eine konstitutive NF-IL6-Expression vor und spielt unter anderem neben seiner Bedeutung für die Gedächtnisbildung auch für die Neurogenese in dieser Gehirnstruktur eine wichtige Rolle (Cortes-Canteli et al., 2011). Eine konstitutive NF-IL6-Immunreaktivität ist auch in den Ependymzellen der Ventrikel und in der Hypophyse (vorwiegend im Vorderlappen) bereits beschrieben worden, wobei hier beachtet werden muss, dass eine zusätzliche Steigerung der Anzahl und Intensität der Signale durch einen LPS-Stimulus möglich ist (Damm et al., 2011). In den Zellen der sCVO’s (OVLT, SFO und AP) treten nach LPS-Stimulation nukleäre NF-IL6 Signale auf, was die Hypothese stützt, dass NF-IL6 im Rahmen von Entzündungsreaktionen die Weiterleitung von Signalen aus der Peripherie zu den entsprechenden Gebieten des Hypothalamus vermittelt (Damm et al., 2011). Die bereits identifizierten, auf Stimulation mit LPS oder Zytokinen reagierenden Zelltypen sind sehr unterschiedlich und reichen von Neuronen, Astrozyten und Mikrogliazellen (Pahan et al., 2002, Ejarque-Ortiz et al., 2007) bis zu Endothelzellen und perivaskulären Makrophagen des ZNS von Ratten (Damm et al., 2011) und wurden zumindest für Neurone (Sterneck and Johnson, 1998), Astrozyten und Mikrogliazellen (Ejarque-Ortiz et al., 2007) auch schon in Mäusen beschrieben, ohne dass jedoch genaue Verteilungsmuster der Aktivierung im Gehirn bestimmt worden sind.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig die induzierbare NF-IL6-Immunreaktivität auf Ebene der Hypophyse phänotypisch in der Ratte charakterisiert, wobei sowohl Pituizyten im Hinterlappen als auch Endothelzellen bzw. perivaskuläre Makrophagen in allen Anteilen analysiert wurden. Zusätzlich wurde das NF-IL6-Aktivierungsmuster des Mäusegehirns nach

LPS-Stimulation zum ersten Mal auch für die CVOs und andere Gehirnstrukturen genauer untersucht.

5.5. NF-IL6 in der Thermoregulation und die Entstehung von Fieber

Fieber entsteht durch eine aktive Hochregulation der Körperkerntemperatur im sog. „Thermoregulationszentrum“, also in der präoptischen Region des anterioren Hypothalamus (POAH) (Cooper et al., 1967, Jackson, 1967, Baumgartner et al., 1996). Diese Erhöhung entsteht durch eine Zusammenarbeit von wärmeproduzierenden und wärmekonservierenden Thermoeffektoren. Es gibt eine sog. „Zwischenschwellenzone“, die sich aus spezifischen Aktivierungsschwellen von Thermoeffektoren und deren Regelkreisen zusammensetzt sowie unter physiologischen Bedingungen die Aufrechterhaltung einer konstanten Körperkerntemperatur gewährleistet (Romanovsky, 2007). Bei der Entstehung von Fieber erfolgt eine Verschiebung dieser Aktivierungsschwellen (Roth et al., 2006, Romanovsky, 2007) und das betroffene Individuum ändert zusätzlich sein Verhalten (Aufsuchen warmer Liegeplätze, Zusammenlegen mit Artgenossen) und erhöht aktiv die Wärmeproduktion (zitterfreie Thermogenese, Erhöhung des Stoffwechsels) (Kluger, 1991).

Des Weiteren gehört auch Fieber zum Komplex des „sickness behavior“ und gilt als wichtigstes Anzeichen einer bakteriellen Infektion (Blatteis, 1986). LPS-induzierte NF-IL6-Signale wurden bisher auch in den für die Entstehung von Fieber wichtigen Gehirnregionen detektiert (Damm et al., 2011). Zu diesen gehören das OVLT, der *Nucleus preopticus medianus* (MnPO) und das SFO (Roth et al., 2009). Vor allem dem OVLT wird durch seine anatomische Lage eine besondere Bedeutung in der Fieberentstehung beigemessen (Scammell et al., 1996). Im Rahmen einer LPS-induzierten Fieberreaktion ist sekundär im Gehirn gebildetes PGE₂ ein wichtiger terminaler Mediator bei der Entstehung von Fieber (Stitt, 1986, Steiner et al., 2006) und wirkt in der POAH hemmend auf warm-sensitive Neurone, was als eine Art „Basismechanismus“ für die Entwicklung von Fieber angesehen wird (Hori et al., 1988, Xin and Blatteis, 1992). Sowohl Gehirndothelzellen (Matsumura and Kobayashi, 2004) als auch Endothelzellen der BHS (Engblom et al., 2002) und perivaskuläre Makrophagen (Elmqvist et al., 1997a) können in diesem Zusammenhang PGE₂ bilden. Durch die Enthemmung kalt-sensitiver Mechanismen erfolgt eine zusätzliche Wärmebildung (Nagashima et al., 2000). Die im gleichen Zug dokumentierte NF-IL6-Aktivität im *Nucleus raphe pallidus* (RPa) könnte auch im Zusammenhang mit einer PGE₂-vermittelten Fieberentstehung stehen (Damm et al., 2011). Nakamura und Kollegen (2002) konnten zum Beispiel zeigen, dass Signale aus der präoptischen Region des anterioren Hypothalamus über diese Struktur zu präganglionären, sympathischen Neuronen projizieren, die wiederum über die Aktivierung der Effektororgane, wie das braune Fettgewebe (BAT, zitterfreie Thermogenese), an der Entstehung von Fieber beteiligt sind (Nakamura et al., 2002, Nakamura and Morrison, 2007, 2011).

5.6. Die Rolle von NF-IL6 in der HPA-Achse

In Bezug auf die mögliche Beteiligung von NF-IL6 für die Aktivierung der HPA-Achse im Rahmen einer Entzündungs- oder Stressreaktion, sind mehrere Regionen des Gehirns bzw. mehrere „Ebenen“ der HPA-Achse als potenzielle Wirkorte für NF-IL6 denkbar. Zunächst einmal betrachten wir den PVN des anterioren Hypothalamus und die sich dort befindlichen CRH-produzierenden Zellen. NF-IL6 könnte sowohl direkt als auch indirekt die Freisetzung von CRH bewirken. Die Beeinflussung der Aktivierung des CRH-Promotors durch NF-IL6 wurde bereits nachgewiesen (Stephanou et al., 1997). Das bedeutet, dass eine direkte Verbindung von NF-IL6 und der Freisetzung von CRH aus dem PVN und der darauffolgenden Produktion von POMC existieren könnte. Auch indirekt würde NF-IL6 Einfluss nehmen können, indem dieser Transkriptionsfaktor weitere Faktoren der CRH-Freisetzung reguliert, wie beispielsweise die Mediatoren NO oder PGE₂. Bekannt ist in diesem Zusammenhang bereits, dass NF-IL6 die Expression sowohl von COX-2 als auch von iNOS erhöhen kann (Kolyada and Madias, 2001, Chun and Surh, 2004).

Die nächste Ebene auf welcher eine Beeinflussung der HPA-Achse möglich sein könnte, ist die Hypophyse, die über die ME mit diesem in Verbindung steht. In Experimenten mit Hypophysen-Adenomzellen konnte bereits gezeigt werden, dass eine Überexpression von NF-IL6 auch eine erhöhte Expression des ACTH-Vorläufermoleküls POMC zur Folge haben kann (Abbud et al., 2004). Dementsprechend wurde bereits eine Bindungsstelle für NF-IL6 am POMC-Promotor nachgewiesen, so dass eine Beteiligung von NF-IL6 in der ACTH-Produktion wahrscheinlich ist (Abbud et al., 2004). Bei der Aktivierung der HPA-Achse gelangt das aus Nervenendigungen der CRH-Neurone in die ME abgegebene CRH über das Portalvenensystem in den HVL. Dort bewirkt es die Freisetzung von ACTH aus den corticotropen Zellen. Dieses gelangt wiederum über den Blutkreislauf zur Rinde der Nebenniere und bewirkt die Freisetzung von Corticosteron bzw. Cortisol (Aguilera, 2011). Die oben beschriebene potenzielle Bedeutung von NF-IL6 sowohl für die CRH-Freisetzung als auch für die ACTH-Produktion bzw. Freisetzung legt nahe, dass dieser Transkriptionsfaktor an der Aufrechterhaltung der Homöostase des Organismus beteiligt sein und auch im Rahmen der Reaktion auf Stress (physisch oder emotional) regulierend eingreifen könnte. Diese bis dato noch ungeklärten Zusammenhänge wurden in der vorliegenden Arbeit näher untersucht.

Wie bereits beschrieben (siehe Kapitel 5.3.6) kann NF-IL6 mit anderen Transkriptionsfaktoren z. B. STAT3 „zusammenarbeiten“ (Akira et al., 1990, Chang et al., 1990, Descombes et al., 1990, Poli et al., 1990). Gautron und Kollegen zeigten bereits 2003, dass in der Hypophyse im Zuge einer LPS-Stimulation IL-6 den Transkriptionsfaktor STAT3 aktiviert (Gautron et al., 2003). Des Weiteren kann IL-6 auch den Transkriptionsfaktor NF-IL6 aktivieren, weshalb zukünftige Colokalisationsstudien mit NF-IL6 und STAT3 bzw. die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen zu neuen Erkenntnissen in diesem Themengebiet führen sollen.

6. Lipopolysaccharid (LPS)

LPS ist ein thermostabiler Bestandteil der äußeren Membran gram-negativer Bakterien mit einem Molekulargewicht von 5 bis 9000 kDa. Es gehört zu den bereits erwähnten sog. PAMPs, wird von lebenden und von absterbenden Bakterien freigesetzt und aufgrund seiner fiebererzeugenden Eigenschaften sowohl als Endotoxin als auch als exogenes Pyrogen bezeichnet (Freudenberg and Galanos, 1990). Es besteht aus drei miteinander verbundenen Teilen: einem die Antigenität vermittelnden Polysaccharidanteil, einem Wirkungsvermittelnden Lipid-A-Anteil und einer Kernregion (Rietschel et al., 1994, Holst et al., 1996). Nach der Lyse der gram-negativen Bakterien und somit dem Freiwerden von LPS bzw. der experimentellen Injektion der Substanz, bindet es im Blut an das sog. LPS-Bindungsprotein (LPB) (Schumann et al., 1990). Der LPS-LPB-Komplex wird an lösliche (sCD14) oder membrangebundene CD14-Rezeptoren gebunden (Chen et al., 1992, Schletter et al., 1995), die wiederum als LPS-LPB-CD14-Komplex über den TLR4 und über das Adaptermolekül MyD88 eine entsprechende Signalkaskade auslösen (Induktion von NF κ B und unter anderem Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α und IL-1 β). Die Rezeptoren TLR4 und CD14 wurden bereits auf Monozyten, Makrophagen und auch in den sCVO's beschrieben (Laflamme and Rivest, 2001, Laflamme et al., 2003) (siehe Kapitel 5.1).

Um in einer tierexperimentellen Untersuchung eine Entzündungsreaktion mit Fieber hervorzurufen, hat sich purifiziertes LPS als sehr gut dosierbar und reproduzierbar erwiesen und wird am häufigsten verwendet, obwohl sich prinzipiell sowohl Bakterien als auch Viren und Pilze bzw. deren Bestandteile zur Erzeugung von Fieber bzw. Entzündungsreaktionen eignen. Ratten und Mäuse sind im Gegensatz zu vielen anderen Säugetieren und vor allem dem Menschen vergleichsweise weniger sensitiv gegenüber LPS (Rummel et al., 2011). Bei der Verwendung speziesspezifisch unterschiedlicher Dosierungen führt die i.v. oder auch intraperitoneale (i.p.) LPS-Injektion bei Labornagern zu einem starken Anstieg der Plasma-ACTH-Plasmakonzentration (<30-60 Minuten) (Carlson, 1997) und wurde auch in der vorliegenden Arbeit verwendet. Die durch LPS vermittelte Wirkung auf die HPA-Achse kommt möglicherweise nicht durch eine direkte Interaktion zwischen LPS und den beteiligten Geweben der HPA-Achse zustande, sondern über weitere Mediatoren des Immunsystems (Tilders et al., 1994). Dies wurde in mehreren Studien untersucht, in denen kein direkter Effekt von LPS auf die CRH-Freisetzung aus hypothalamischen Gewebestücken bzw. keine ACTH-Freisetzung aus HVL-Zellkulturen der Ratte bewirkt werden konnte (Brunetti et al., 1994, Pozzoli et al., 1994). Weitere Zusammenhänge zwischen LPS-Gabe und HPA-Achsen-Aktivierung bzw. der Rolle der Zytokine TNF- α , IL1- β und IL-6 in dieser Signalvermittlung wurden in der vorliegenden Arbeit in einer primären Zellkultur des HVL weitreichend untersucht. Die Stimulation mit LPS verursacht NF-IL6-Signale in vielen verschiedenen Zelltypen. In den sCVO's wurde auch eine direkte Wirkung von LPS auf die NF-IL6 Expression postuliert (Damm, 2012), die so auch schon für STAT3 diskutiert worden war (Rummel et al., 2005). Wie oben bereits erwähnt, spielt das Adapterprotein MyD88 zusammen mit dem Rezeptor TLR4 eine entscheidende Rolle bei dieser direkten Signalweiterleitung und Aktivierung von NF-IL6. Im Zusammenhang mit einer LPS-Stimulation findet eine NF-IL6-Aktivierung aber wahrscheinlich auch indirekt über

proinflammatorische Zytokine (TNF- α , IL-1 β , IL-6) statt (Akira and Kishimoto, 1992). So korrelierte die höchste NF-IL6-Immunreaktivität nach LPS-Stimulation zeitlich mit der höchsten Konzentration des Zytokins IL-6 im Blutplasma (Damm et al., 2011). In den für diese Arbeit vorliegenden Teilstudien wurde nicht nur untersucht, welche Zytokine in der Hypophyse nach Stimulation der HPA-Achse mit LPS eine Rolle spielen, miteinander interagieren und potenziell an der Produktion bzw. Freisetzung von ACTH beteiligt sind, sondern auch welche Rolle dabei der Transkriptionsfaktor NF-IL6 haben könnte.

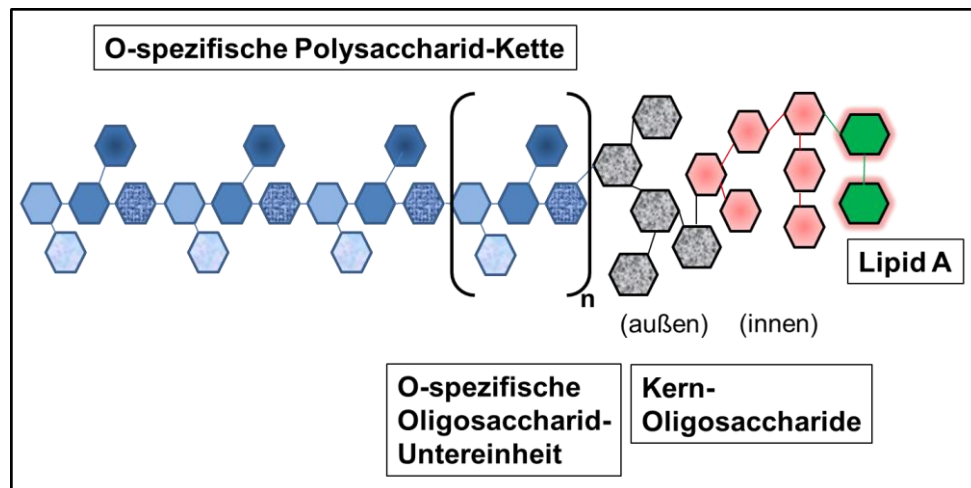


Abbildung 6-1

Schematische und vereinfachte Darstellung von LPS (Lipopolysaccharid).

Dieses komplexe Molekül besteht aus drei miteinander verbundenen Teilen: 1. einem die Antigenität vermittelnden Polysaccharidanteil, 2. einer Kernregion und 3. einem Wirkungsvermittelnden Lipid-A-Anteil.

Abbildung modifiziert nach (Raetz, 1990, Metzger et al., 2012).

7. Zytokine

Die Zytokinforschung stellt im Rahmen der medizinischen Grundlagenwissenschaft ein sehr interessantes Gebiet dar. Ihre komplexen Aufgaben und ihre Bedeutung bei neuroimmunologischen und endokrinologischen Abläufen sind bisher nur sehr unzureichend erforscht. Sie spielen eine große Rolle bei der Stressantwort der HPA-Achse und wirken sowohl auf Bereiche des Hypothalamus, auf die Hypophyse und auch direkt auf die Nebenniere. Zytokine sind große Polypeptide, Glykoproteine oder kleinere Proteine mit einer Molekülmasse von weniger als 30 kDa und mit einer Länge von 100-200 Aminosäuren (Schooltink and Rose-John, 2002). Das Wort „Zytokin“ ist im Grunde genommen nur ein Übergriff für weit mehr als 100 verschiedene Mediatoren und da es bis heute keine ganz einheitliche Nomenklatur gibt, fällt eine sinnvolle Einteilung nicht leicht. Früher fand eine grobe Unterteilung in Interleukine, Wachstumsfaktoren, Interferone und Chemokine statt (Thomson, 1994), allerdings wird mittlerweile eine Einteilung nach der Molekülstruktur und der Rezeptorklasse bevorzugt (Schooltink and Rose-John, 2002, Abbas et al., 2011).

Zytokine sind wichtige Mediatoren des Immunsystems und koordinieren im Falle von Störungen die Kommunikation zwischen den einzelnen Zellen und den Organen des Körpers. Sie werden vor allem von Zellen des angeborenen und des adaptiven Immunsystems und von

Endothel- und Epithelzellen als Antwort auf eingedrungene Mikroorganismen oder andere Antigene produziert. Als Mediatoren des angeborenen Immunsystems aktivieren sie natürliche Killerzellen und Makrophagen und als Mediatoren des erworbenen Immunsystems stimulieren sie das Wachstum, die Aktivierung sowie die Differenzierung von Lymphozyten. Des Weiteren regulieren sie die Hämatopoese im Knochenmark (Kindt et al., 2007). In gesunden, nicht gestressten Individuen sind die Konzentrationen an Zytokinen sehr gering (10^{-15} bis 10^{-12} M), können aber innerhalb von Minuten auf Werte von 10^{-9} bis 10^{-7} M ansteigen (Conti et al., 2004). Sie wirken entweder lokal, das heißt auf die Zelle selbst (autokrin) oder in der näheren Umgebung (parakrin) oder systemisch und endokrin z. B. bei der Induktion der APR. Mit Ausnahme der Mastzellen, die präformierten TNF- α enthalten können, werden Zytokine akut *de novo* synthetisiert, abgegeben und innerhalb kürzester Zeit wieder abgebaut (McCurdy et al., 2001).

Weitere sehr wichtige Eigenschaften der Zytokine sind ihre Redundanz (strukturell unterschiedliche Zytokine haben einen fast identischen Effekt), die Pleiotropie (ein Zytokin wirkt auf verschiedene Zellen) und der Synergismus (der Effekt durch zwei zusammen wirkende Zytokine ist differenziert bzw. größer als der Einzeleffekt) bzw. Antagonismus (zwei Zytokine haben eine gegenteilige Wirkung). Auch typisch ist zum einen die sog. Zytokinkaskade bei der ein einzelnes Zytokin die Produktion eines anderen Zytokins erhöhen bzw. reduzieren kann (TNF- α \rightarrow IL-1 β \rightarrow IL-6) und zum anderen die sog. Rezeptormodulation, bei der ein einzelnes Zytokin die Expression des Rezeptors eines anderen Zytokins steigert oder vermindert (Zeisberger, 1999). Aufgrund ihrer geringen Halbwertszeit, der niedrigen Wirkkonzentration und der strengen Regulation der Rezeptorexpression binden Zytokine sehr spezifisch an ihren jeweiligen Rezeptor (Vilcék, 1994). Dennoch ist es schwierig, für ein einzelnes Zytokin vorauszusagen wie es im Körper wirkt und mit anderen interagiert bzw. Wirkungen einzelner Zytokine isoliert zu betrachten, da alle Zellen in einem orts- und situationsspezifischen „Zytokin-Milieu“ praktisch „baden“. Die membranständigen Zytokinrezeptoren werden nach der Stimulation der Zellen auf ihrer Oberfläche zum Teil vermehrt exprimiert, wodurch die Wirkung der Zytokine vor allem auf bestimmte Zellpopulationen beschränkt bleibt. Am extrazellulären Teil der Rezeptoren wird der Ligand spezifisch gebunden und löst eine Dimerisierung bzw. Multimerisierung von einer oder mehreren Rezeptorkomponenten aus. Die Bildung des Liganden-Rezeptorkomplexes induziert die daraufhin stattfindende intrazelluläre Signalkaskade und diese die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie STAT3 (aktiviert durch IL-6) oder NF- κ B (aktiviert durch IL-1), die für proinflammatorische Zielgene kodieren (Kishimoto et al., 1994, Heldin, 1995).

Auf die für die vorliegende Arbeit relevanten pro- und antiinflammatorischen Zytokine wird nun genauer eingegangen: die proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1 β und IL-6 haben trotz ihrer deutlichen Unterschiede bezüglich Struktur und biologischer Wirkung auch einige Gemeinsamkeiten (Turnbull and Rivier, 1999). Sie alle aktivieren die HPA-Achse sowie T- und B-Zellen, induzieren die APR und führen zur Entstehung von Fieber und „sickness behavior“.

7.1. Zytokine und physischer oder emotionaler Stress

Zytokine, insbesondere IL-1 β und IL-6 spielen nicht nur bei Verletzungen, Entzündung oder Infektionen eine wichtige Rolle, sondern auch bei der Verarbeitung von Stress (siehe Kapitel 4.4) (LeMay et al., 1990, Zhou et al., 1993, Mekaouche et al., 1994, Shintani et al., 1995a).

In verschiedenen Experimenten wurde gezeigt, dass Ratten, nachdem sie in eine neue Umgebung überführt wurden (ein sog. „open field“), einen schnellen Anstieg (<15 Minuten) der IL6-Konzentration im Plasma und eine erhöhte Körperkerntemperatur zeigten (LeMay et al., 1990), welche nach 60-120 Minuten wieder auf die ursprünglichen Werte zurückgekehrt war. Außerdem wurde festgestellt, dass das Immobilisieren der Tiere zu einer Erhöhung der IL-1 β -mRNA im Hypothalamus führte (Suzuki et al., 1997). Die Tatsache, dass Zytokine innerhalb von Minuten an der Reaktion auf Stress beteiligt sein können, ohne dass eine Verletzung von Gewebe oder eine Infektion des Organismus vorliegt, weist darauf hin, dass Zytokine womöglich einen immer noch nicht ausreichend untersuchten Stellenwert zur Aufrechterhaltung der Homöostase des Körpers einnehmen und dass die Antwort auf körperlichen oder emotionalen Stress sich womöglich kaum von der Antwort auf entzündliche oder infektiöse Stimuli unterscheidet (Shintani et al., 1995b). Auch durch emotionale Stimuli können die thermosensitiven Neurone der präoptischen Region aktiviert werden (siehe Kapitel 5.5), was den Anstieg der Körpertemperatur um bis zu 2°C erklären könnte (Hori et al., 1986, Oka et al., 2001). In weiteren Studien konnte demonstriert werden, dass adrenaletomierte Ratten nach der Stressexposition durch ein „open field“ ein signifikant höheres Fieber entwickelten und auch signifikant höhere IL-6 Werte aufwiesen als ihre Kontrolltiere (Morrow et al., 1993). Die vorausgehende Behandlung der Tiere mit einem Cyclooxygenase-Hemmer verhinderte dagegen den Anstieg der Körpertemperatur (Singer et al., 1986a). Man geht bisher davon aus, dass dieser Anstieg der Körperkerntemperatur ein echtes Fieber darstellt und PGE₂ vermittelt sein könnte. Im entsprechenden Signalweg werden zunächst noradrenerge Neurone des *Locus caeruleus* aktiviert und die Signale somit bis in die präoptische Region des Hypothalamus weitergegeben, wo durch die Freisetzung von Noradrenalin die Synthese von PGE₂ in Neuronen oder Astrozyten bewirkt wird. Dieses PGE₂ verändert die Feuerungsrate der thermosensitiven Neurone (Nakane et al., 1994, Sehic et al., 1996). Ob diese Erhöhung der Körpertemperatur eine ähnliche Bedeutung hat wie das eine Infektion begleitende Fieber, ist noch nicht vollständig geklärt.

7.2. Tumornekrosefaktor (TNF)

Der Tumornekrosefaktor ist ein Mitglied der TNF/TNFR-Superfamilie und existiert in α - und β -Form. Der Name entstand durch die Entdeckung, dass TNF als Serumfaktor zu einer hämorrhagischen Nekrose von Hautsarkomen bei Mäusen führt (Carswell et al., 1975). Tumornekrosefaktor- β , auch Lymphotoxin- α (LT) genannt, wird vorwiegend von aktivierten Lymphozyten produziert. TNF- α hingegen wird von aktivierten, mononukleären Phagozyten, Mastzellen, aktivierten T-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen gebildet und ist somit der wichtigste Mediator der akuten Entzündungsreaktion auf Mikroorganismen.

TNF- α wird zunächst als ein 26 kDa schweres, Typ II Transmembran-Protein synthetisiert und lagert sich dann in stabilen Homotrimeren zusammen. Daraufhin erfolgt die Spaltung in seine aktive Form durch die Metalloprotease TACE („tumor necrosis factor alpha converting enzyme“). Dieses Enzym kann außerdem TNF-Rezeptoren aus der Zellmembran lösen, die dann als TNF-Bindungsprotein (TNFbp) agieren und die Aktivität von TNF- α regulieren können (Bemelmans et al., 1996, Roth et al., 1998). Der lösliche TNF- α (17 kDa pro Untereinheit) kann über zwei verschiedene, ubiquitär exprimierte Rezeptoren wirken: den TNF-R1 (55 kDa) sowie den TNF-R2 (75 kDa), der TNF mit höherer Affinität bindet (Bazzoni and Beutler, 1996). Nur die extrazellulären Domänen beider Rezeptoren sind identisch, weshalb man davon ausgeht, dass beide Rezeptoren unterschiedliche Signalwege in der Zelle auslösen (Lewis et al., 1991). TNF-R1 induziert die Aktivierung von NF- κ B über das Adapterprotein TRADD („TNF-R associated death domain“) und somit die Bildung von Entzündungsmediatoren oder führt zur Apoptose über die Bindung des Adaptors FADD („Fas associated death domain“). TNF-R2 hingegen induziert die Aktivierung von NF- κ B über die Rekrutierung von TRAF 1 und 2 (TNF-Rezeptorassoziierte Faktoren), die wiederum NF- κ B aktivieren (Turnbull and Rivier, 1999).

TNF- α spielt zusammen mit IL-1 β und IL-6 die Hauptrolle bei Fieberreaktionen durch eine bakterielle Infektion (gram-negative Bakterien) (Blatteis, 2004) und ist als erstes Zytokin im Blut nachweisbar (Kluger, 1991, Roth et al., 1993, Jansky et al., 1995). Wenn TNF- α selbst i.v. appliziert wird, entsteht Fieber und die IL-1 β -Konzentration im Blut steigt an (Dinarello, 2004). Die Anwendung von sog. „Anti-Zytokin-Strategien“ dagegen, also der gezielten Entfernung von TNF- α aus dem Serum durch passive Immunisierung, reduzierte nicht nur das induzierte Fieber, sondern auch die Konzentrationen von IL-1 β und IL-6 im Blutplasma (Cooper et al., 1994, Roth et al., 1998). Auf der anderen Seite konnte gezeigt werden, dass es nach Neutralisierung der TNF- α -Bioaktivität zu einer Verstärkung LPS-induzierter Fieberreaktionen kommt (Long et al., 1990a). Ob TNF- α nun als pro- oder antiinflammatorisches Zytokin bezeichnet werden kann, ist weiterhin umstritten, da sowohl pyrogene als auch antipyrogene Eigenschaften beschrieben wurden (Conti et al., 2004). Die Fieberantwort in TNFR-Knock-out-Mäusen unterschied sich nach einer LPS-Injektion kaum von der Reaktion der Wildtyp-Mäuse und nach i.p. Injektion einer hohen LPS-Dosis kam es entgegen den Erwartungen zu einer erhöhten Fieberantwort (Leon et al., 1997).

Systemisch appliziertes TNF- α aktiviert im Rahmen eines Entzündungsgeschehens auch die HPA-Achse, indem es die neuronale CRH-Ausschüttung mit darauffolgender Freisetzung von ACTH und Cortisol bzw. Corticosteron bewirkt. Dies könnte auch durch direkte Effekte von TNF- α an den Axonen der CRH-Neurone der ME mit unterbrochener BHS stattfinden (Bernardini et al., 1990). Außerdem kann TNF- α nach einem entzündlichen Stimulus von Mikrogliazellen im Gehirn als sekundärer Mediator gebildet werden, welcher dann direkt im PVN wirken könnte. Schließlich darf man nicht unbeachtet lassen, dass auch die TNF- α -induzierte Synthese von weiteren Mediatoren (Prostaglandine und Thromboxane) im Gehirn indirekt eine Aktivierung der CRH-Neurone im PVN des Hypothalamus veranlassen könnte (Bernardini et al., 1990). Welche dieser Möglichkeiten am wahrscheinlichsten ist oder ob sie parallel existieren, ist noch nicht abschließend geklärt. Im Widerspruch zur HPA-

aktivierenden Eigenschaft von $\text{TNF-}\alpha$ wurde in einer Zellkulturstudie gezeigt, dass peripherer $\text{TNF-}\alpha$ die CRH-stimulierte Freisetzung von ACTH und anderen Hormonen verhindert (Gaillard et al., 1990). Dieser hemmende Effekt könnte erklären, weshalb Patienten mit septischem Schock und gleichzeitig hohen $\text{TNF-}\alpha$ -Konzentrationen im Blut keine adäquate Antwort der HPA-Achse und eine erhöhte Mortalität aufweisen. Durch welche Zellen $\text{TNF-}\alpha$ in der Hypophyse selbst produziert werden kann, konnte bis dato noch nicht abschließend geklärt werden (Gatti and Bartfai, 1993, Laye et al., 1994, Pitossi et al., 1997, Arzt et al., 1999).

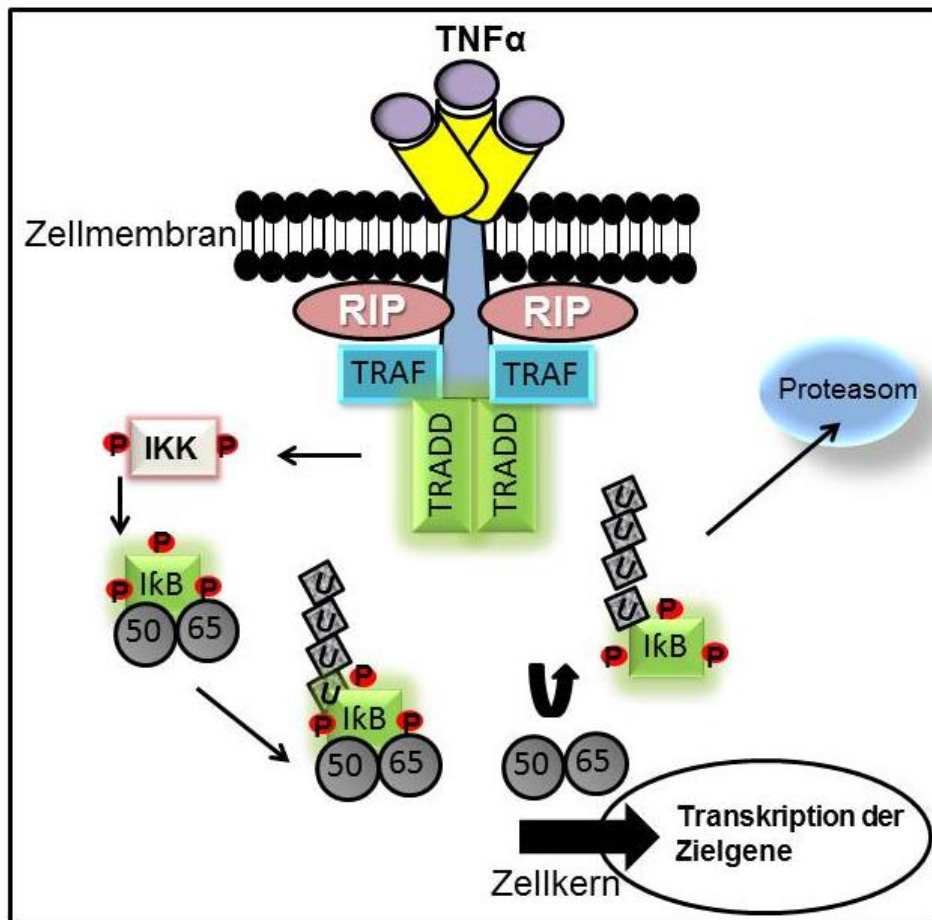


Abbildung 7-1

Schematische Darstellung der Signaltransduktion von $\text{TNF-}\alpha$ über NF κ B.

Nachdem $\text{TNF-}\alpha$ an seinen Rezeptor (TNFR-1) gebunden hat, assoziiert das Adaptermolekül TRADD („TNF-receptor 1-associated DEATH domain protein“) an den Rezeptor. Dadurch kommt es zur Bindung von weiteren Molekülen wie TRAF („TNF-receptor associated factor“) oder RIP („receptor-interacting protein“). Dieser entstandene Komplex (TNFR-1, TRAF und RIP) aktiviert die I κ B Kinase (IKK), die die Phosphorylierung des inhibitorischen Proteins I κ B katalysiert (DiDonato et al., 1997, Mercurio et al., 1997). Dies bewirkt die Freisetzung des zytosolischen NF κ B (aus p50 und p65), welches in den Zellkern einwandert und die Transkription der Zielgene steigern kann. Das inhibitorische Protein I κ B wird über eine Ubiquitin-Ligase mit mehreren Ubiquitin-Molekülen gebunden und im Proteasom abgebaut.

7.3. Interleukin 1 (IL-1)

Es kommen mindestens drei verschiedene Glykoproteine vor, die zu der Interleukin-1 Gruppe gehören, namentlich zwei Agonisten IL-1 α und IL-1 β und der Antagonist IL-1ra („interleukin-1 receptor antagonist“). Der Rezeptor-Antagonist IL-1ra bindet auch an die IL-1-Rezeptoren ohne jedoch eine entsprechende Wirkung hervorzurufen (Hannum et al., 1990). IL-1 α und IL-1 β entstehen aus zwei unterschiedlichen Genprodukten, zwei je 31 kDa schweren Proproteinen und sind nur zu 25 % homolog. Trotzdem binden sie an den gleichen Rezeptor und teilen eine Reihe von biologischen Wirkungen (Dinarello, 1991). Für die vorliegende Arbeit ist vor allem IL-1 β von Bedeutung, welches durch ICE („IL-1 β converting enzyme“ oder „cysteine protease caspase-1“) in die aktive und nur noch 17 kDa schwere Form überführt wird. IL-1 α ist in beiden Formen aktiv. (Keane et al., 1995). IL-1 β wird wie TNF von aktivierten Makrophagen bzw. ungleich wie TNF auch von neutrophilen Granulozyten, Epithel- und Endothelzellen gebildet. Im Gehirn können auch Mikrogliazellen und perivaskuläre sowie meningeale Makrophagen IL-1 β synthetisieren (Van Dam et al., 1995). Es wird davon ausgegangen, dass IL-1 β im Rahmen einer Entzündungsreaktion bei der Signalweiterleitung an das ZNS zunächst in den CVO's gebildet wird und dann in das Gehirnparenchym übertreten kann (Konsman et al., 1999). Es existieren zwei schon länger bekannte IL-1 Rezeptoren: IL-1R1 (80 kDa) und IL-1R2 (60 kDa) (Sims and Dower, 1994). Der IL-1R1 bindet IL-1 und vermittelt dessen biologische Wirkung (Aktivierung von Transkriptionsfaktoren NF κ B und AP-1), wohingegen der IL-1R2 IL-1 mit höherer Affinität bindet, aber ohne eine Signalweiterleitung zu induzieren (Colotta et al., 1993). Kürzlich wurde auch ein dritter IL-1-Rezeptor nämlich IL-1R3 charakterisiert, welcher vorwiegend in Geweben des ZNS exprimiert wird. Über diesen Rezeptor aktiviert IL- β nicht seinen klassischen Signalweg, sondern nutzt eine schnelle und NF κ B- bzw. p38 MAPK-unabhängige Signalkaskade (Proteinkinase B- oder auch „Akt“-Signalweg) zur Aktivierung von Neuronen (Qian et al., 2012). Die Rezeptoren für IL-1 β sind im ZNS weit verbreitet und befinden sich unter anderem im *Plexus choroideus*, den Meningen, dem *Gyrus dentatus*, dem *Hippocampus*, dem *Cerebellum* und dem *Bulbus olfactorius*. Aber auch im Hypothalamus und in der ME (Farrar et al., 1987). IL-1 β ist zusammen mit TNF- α und IL-6 maßgeblich an der sog. Zytokinkaskade und Entstehung von Fieber beteiligt und wird somit auch als endogenes Pyrogen bezeichnet. Studien mit Menschen sowie Kaninchen und anderen Nagern zeigten, dass die Injektion von IL-1 β zur Entstehung von Fieber und Bildung von IL-6 führt (Layé et al., 2000, Roth and De Souza, 2001, Fortier et al., 2004). Allerdings zeigte sich die Fieberreaktion nach LPS-Injektion bei IL-1-Knock-out-Mäusen lediglich abgeschwächt, blieb aber nicht vollständig aus (Kozak et al., 1995). Eine weitere wichtige Rolle spielt IL-1 β bei der Aktivierung des Enzyms COX-2 zur Bildung von PGE₂ und der Expression von EP3-Rezeptoren, an welche PGE₂ binden kann (Ushikubi et al., 1998). IL-1 β ist im Rahmen der Fieberentstehung (Berkenbosch et al., 1987) bzw. im Rahmen einer Stressreaktion eines der ersten Zytokine, welches die CRH-Neurone des PVN des Hypothalamus stimuliert und somit die nachfolgende ACTH-Freisetzung aus dem HVL und die Corticosteron- bzw. Cortisol-Ausschüttung aus der Nebennierenrinde beeinflussen kann (Goshen and Yirmiya, 2009).

Dabei muss jedoch bedacht werden, dass im parvozellulären PVN selbst keine IL-1-Rezeptoren vorhanden sind (Goshen and Yirmiya, 2009). Das bedeutet, dass IL-1 β indirekt über die terminalen Enden der CRH-Neurone im Bereich der ME wirken könnte oder perivaskuläre Zellen in der *Medulla oblongata* stimuliert, die wiederum das Signal über aminerge Neurone an die CRH- produzierenden Zellen weitergeben (Hayley et al., 2008). Des Weiteren könnten andere perivaskuläre Zellen das Enzym COX-2 induzieren und so über weitere Mediatoren die CRH-Neurone stimulieren (Hayley et al., 2008). Schließlich kann peripheres IL-1 β auch auf direktem Weg an der Nebennierenrinde die Ausschüttung von Corticosteron bzw. Cortisol bewirken (Engstrom et al., 2008) und ist an der Entstehung von zentralnervös gesteuerten Krankheitssymptomen wie Lethargie und Anorexie beteiligt (Dantzer, 2001b). Es wird außerdem diskutiert, dass IL-1 β eine direkte Wirkung auf die Hypophyse haben könnte, um dort die Freisetzung von ACTH zu verstärken und die Ausschüttung von weiteren Hormonen zu bewirken. IL-1 β -Rezeptoren sind dementsprechend im HVL vorhanden und außerdem kann IL-1 β selbst in der Hypophyse synthetisiert werden (Bernton et al., 1987).

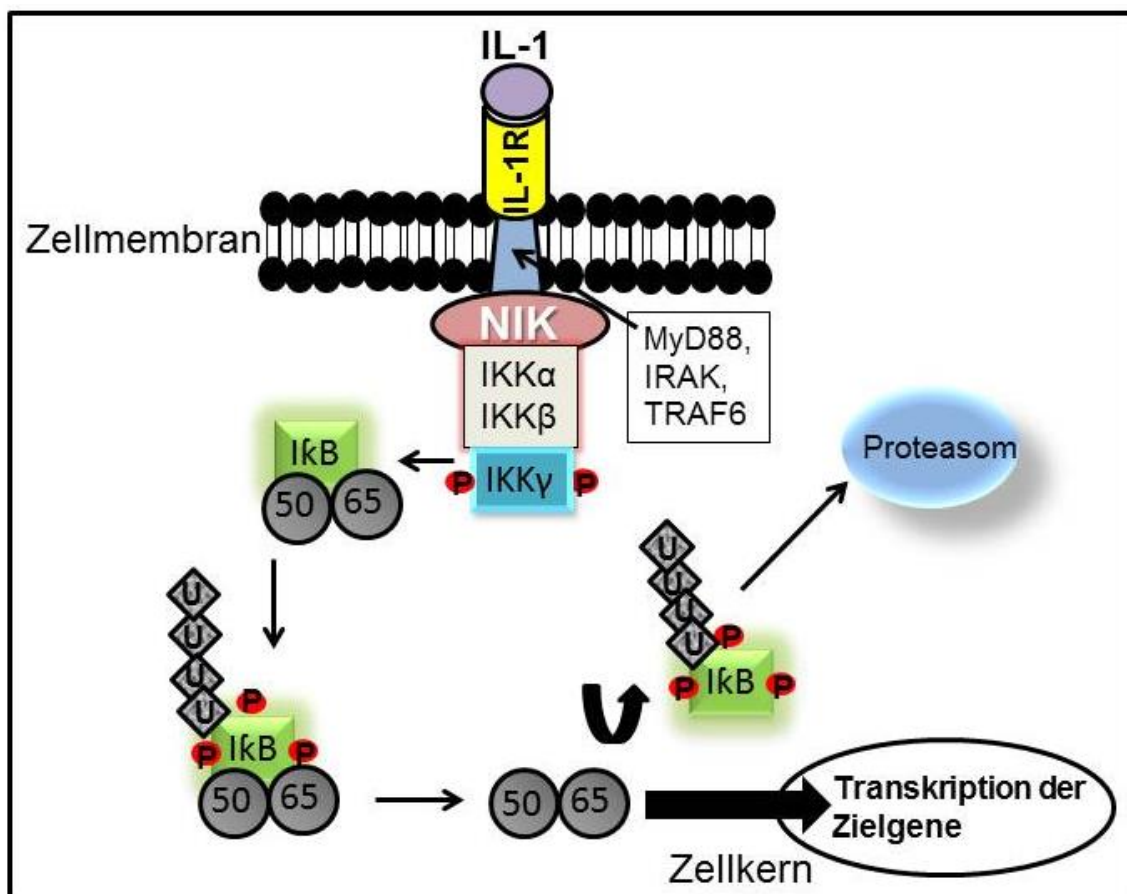


Abbildung 7-2

Schematische Darstellung der Signaltransduktion von IL-1 über NFκB.

Nachdem IL-1 an seinen Rezeptor (IL-1R) gebunden hat, wird über ein Adaptermolekül (MyD88) die IL-1 Rezeptor-assoziierte Kinase (IRAK) durch Autophosphorylierung aktiviert (Martin et al., 1994, Cao et al., 1996, Wesche et al., 1997). Diese wiederum stimuliert den TNF

Rezeptor-assoziierten Faktor 6 (TRAF6). Anschließend aktiviert die NF- κ B induzierende Kinase (NIK) die I κ B Kinase (IKK), die die Phosphorylierung des inhibitorischen Proteins I κ B katalysiert (DiDonato et al., 1997, Mercurio et al., 1997). Dies bewirkt die Freisetzung des zytosolischen NF κ B (aus p50 und p65), welches in den Zellkern einwandert und durch die Bindung an spezifische Promotoren die Transkription der Zielgene (Zellwachstum, Proliferation, Differenzierung, Zytokine, Chemokine) steigern kann. Das inhibitorische Protein I κ B wird über eine Ubiquitin-Ligase mit mehreren Ubiquitin-Molekülen gebunden und im Proteasom abgebaut (siehe Kapitel 5.1.)

Modifiziert nach (Conti et al., 2004).

7.4. Interleukin 6 (IL-6)

IL-6 spielt eine sehr wichtige Rolle bei der humoralen Signalweiterleitung und zentralnervösen Regulation von Krankheitssymptomen und ist ein Marker für die Aktivierung des Immunsystems. Es induziert die APR in der Leber und ist für die Blutbildung und die Entwicklung von Neuronen von Bedeutung (Gruol and Nelson, 1997). IL-6 wird im Rahmen von Entzündungen durch exogene Pyrogene, Verletzungen und anderen Störungen von außen oder durch endogene Pyrogene wie TNF- α , IL-1 β und PGE₂ von Monozyten, Makrophagen, Endothelzellen, Fibroblasten und Synoviozyten und im ZNS von Gliazellen und Neuronen gebildet (Kishimoto et al., 1995, Conti et al., 2004).

Es ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 21 bis 28 kDa (Schwankungen durch Ankopplung unterschiedlicher Zuckeranteile) (May et al., 1988). Das aktive humane IL-6 setzt sich aus 184 Aminosäuren zusammen und entsteht aus einem Vorläufer mit 212 Aminosäuren. Es wurde ursprünglich als BSF-2 (B-Zell stimulierender Faktor-2) bezeichnet (Poupart et al., 1987, Bazan, 1990). Dieses Zytokin gehört zu einer Familie, zu welcher auch IL-11, LIF („leukemia inhibiting factor“), Leptin, CNTF („ciliary neurotrophic factor“), OSM („oncostatin M“), CT-1 („cardiotropin-1“) und CLC („cardiotropin-like cytokine“) gerechnet werden (Kishimoto et al., 1995, Taga and Kishimoto, 1997, Heinrich et al., 1998a, Heinrich et al., 2003). Diese Zytokine haben ein und denselben Weg der Signalweiterleitung gemeinsam. Sie binden an einen membranständigen Rezeptor, dessen Rezeptoruntereinheit das gp130-Molekül besitzt. Der zytokinbindene Teil des IL-6R existiert aber auch als lösliche Form (sIL-6R). Sobald IL-6 an den Rezeptor bindet, kommt es zur Homodimerisierung der Rezeptoruntereinheit gp130 (Signaltransduktionseinheit), was die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren zur Folge hat (STAT3, NF-IL6) (Kishimoto et al., 1994) (Abbildung 7-3). Nach LPS-Gabe korreliert die Konzentration von IL-6 im Blutplasma sowohl mit der Fieberkurve (Ueno et al., 1989, Cocceani et al., 1993) als auch mit der höchsten Immunreaktivität von STAT3 (Roth, 2004, Rummel et al., 2004) und NF-IL6 (Damm et al., 2011). Injizierte man IL-6 alleine, kam es erst bei sehr hohen Dosierungen zur Fieberentstehung (Harré et al., 2002, Rummel et al., 2006) oder es war die gleichzeitige Stimulation mit IL-1 β erforderlich (Luheshi et al., 1996, Cartmell et al., 2000). Die Anwendung von IL-1ra oder TNF- α -Antikörpern reduzierte die IL-6-Konzentrationen im Blutplasma, was durch die zuvor erwähnte Zytokinkaskade erklärbar ist (Elliott et al., 1994, Fisher et al., 1994). IL-6 selbst hat wiederum einen negativen Feedback-Effekt auf die Synthese von TNF- α und IL-1 β (Schindler et al., 1990, Dinarello, 1997). Außerdem ist es im

Gegensatz zu $\text{TNF-}\alpha$ und $\text{IL-1}\beta$, das einzige Zytokin, welches auch bei peripheren Entzündungsreaktionen vom Ort der lokalen Entzündung in das Blutplasma übertritt und allgemein anhaltend erhöht ist (Cartmell et al., 2000, Cartmell et al., 2001, Turnbull et al., 2003). Darüber hinaus wurde in Studien gezeigt, dass in Zellen des OVLT und SFO eine direkte genomische Aktivierung (nukleäre Translokation von STAT3) durch IL-6 stattfindet (Harré et al., 2002, Rummel et al., 2006) und somit eine direkte Beteiligung an der Entstehung von Fieber wahrscheinlich ist. Experimente mit IL-6-defizienten Mäusen, die nach einer LPS- oder $\text{IL-1}\beta$ -Gabe kein Fieber entwickelten, stützen diese Annahme (Chai et al., 1996, Kozak et al., 1998). Genauso wie $\text{TNF-}\alpha$ und $\text{IL-1}\beta$ ist auch IL-6 während einer Entzündungsreaktion an der Aktivierung der HPA-Achse (Turnbull et al., 2003) beteiligt und in der Lage sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Freisetzung von ACTH aus dem HVL zu bewirken (Naitoh et al., 1988, Mastorakos et al., 1993). IL-6-Rezeptoren sind in vielen Regionen des Gehirns und sowohl in der Hypophyse (corticotrope Zellen) als auch in der Nebennierenrinde vorhanden (Ohmichi et al., 1992, Bethin et al., 2000). Es wurde ebenfalls gezeigt, dass Glucocorticoide in Zellkulturen und Zellaggregaten des HVL die IL-6-Produktion hemmen (Spangelo et al., 1990a, Carmeliet et al., 1991). Eine chronische Überproduktion von IL-6 und die damit verbundene Dysregulation der HPA-Achse haben weitreichende Auswirkungen auf den Gesundheitszustand des Organismus während einer chronischen Entzündung, chronischen Stresssituationen, Stoffwechselerkrankungen und dem Altern (Gabay, 2006, Maggio et al., 2006). Je nachdem ob eine akute oder chronische Entzündung vorliegt, scheint IL-6 sowohl pro- als auch antiinflammatorische Eigenschaften zu haben. Im Zuge einer akuten Entzündung vermittelt IL-6 die APR und ist an der Hemmung einer Überreaktion des Immunsystems beteiligt (Gruys et al., 2005). Das bedeutet, IL-6 ist in der Lage die induzierte $\text{IL-1}\beta$ - und $\text{TNF-}\alpha$ -Produktion zu hemmen bzw. die Freisetzung von Antagonisten (IL-1ra) zu bewirken (Aderka et al., 1989, Schindler et al., 1990). Im Gegensatz dazu können, wie oben erwähnt, persistierende hohe Konzentrationen an IL-6 zur Entstehung und/oder Aufrechterhaltung von chronischen Entzündungen beitragen und unterstützen somit die Rekrutierung und Proliferation von Monozyten und Makrophagen, die in diesem Fall schädigende Wirkungen auf das Gewebe haben können (Gabay, 2006).

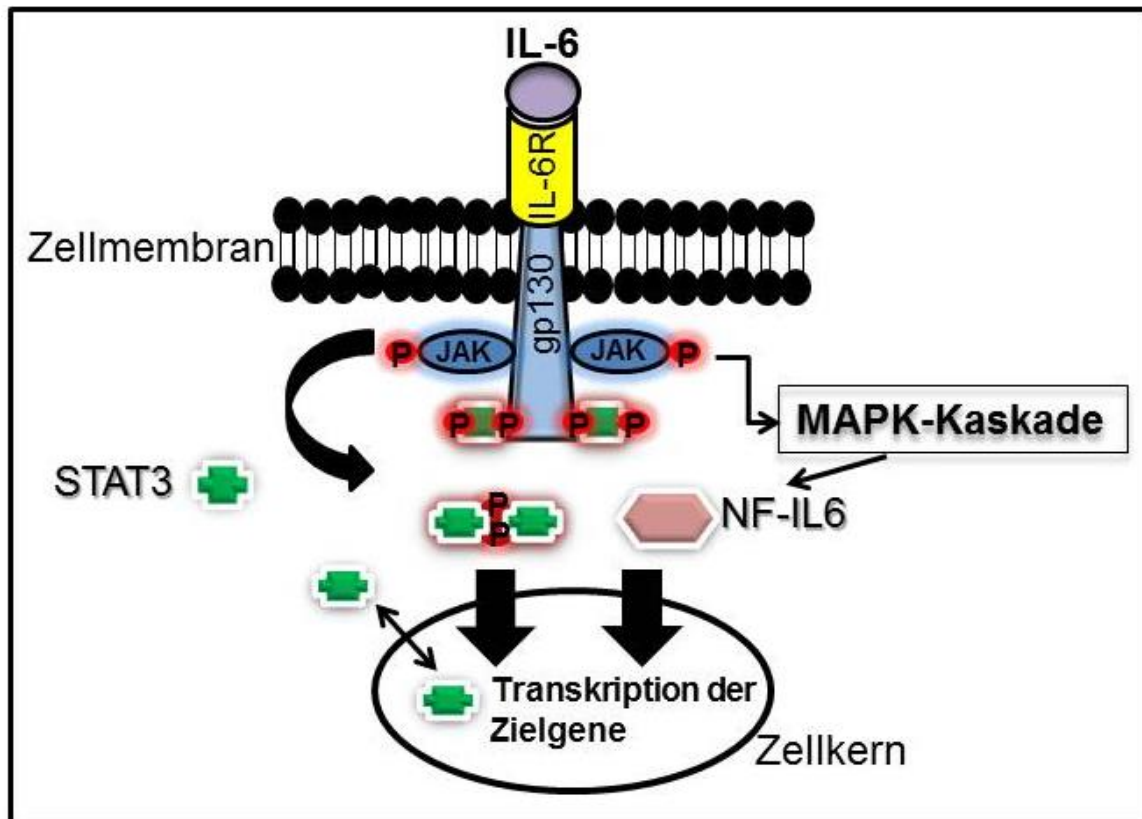


Abbildung 7-3

Schematische Darstellung der Signaltransduktion von IL-6 über zwei unterschiedliche Wege.

Nachdem IL-6 an seinen Rezeptor (IL-6R) gebunden hat, kommt es zur Dimerisierung von zwei gp 130 Untereinheiten. Es folgt eine Autophosphorylierung der am Rezeptorkomplex assoziierten Janus Kinasen (JAK), die wiederum die gp 130 Untereinheiten phosphorylieren. STAT3-Moleküle binden an den gebildeten Komplex und werden gleichermaßen durch JAKs phosphoryliert. Die aktivierten STAT3-Monomere dissoziieren, dimerisieren und translozieren in den Zellkern, wo sie die Transkription ihrer Zielgene über Bindungen an spezifische Promotorstrukturen regulieren. Eine zweite Möglichkeit besteht in der Aktivierung des MAPK-Kaskade („mitogen activated protein kinase“) Signalweges, bei dem unter anderem der Transkriptionsfaktor NF-IL-6 aktiviert wird. Dieser wandert ebenfalls in den Zellkern ein, um die Transkription seiner Zielgene zu regulieren (siehe Kapitel 5.2. und 5.3).

Zusätzlich findet ein konstitutiver Im- und Export nicht-aktivierter STAT3-Moleküle statt.

7.5. Interleukin 10 (IL-10)

IL-10 gehört zur Gruppe der antiinflammatorischen Zytokine, welche eine Entzündung eindämmen und deshalb von besonderem Interesse sind (Opal and DePalo, 2000). Man hofft dieses Zytokin in Zukunft sowohl therapeutisch als auch prophylaktisch einsetzen zu können. Dadurch sollen Komplikationen von Infektionen sowie überschießende Reaktionen des Immunsystems, gefolgt von bleibenden Gewebeschäden und erhöhter Mortalität besser bekämpft werden können (Hunter et al., 1997). IL-10 kann nach einer LPS-Injektion zu einem späten Zeitpunkt (1,5-6 h) im Blutplasma detektiert werden (Durez et al., 1993). Die aus 160 Aminosäuren bestehende aktive Form des IL-10 lagert sich zu einem Homodimer zusammen und wird von Makrophagen, dendritischen Zellen, B- und T- Zellen produziert. Es wirkt vor allem hemmend auf die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen (TNF- α , IL-1 α und

IL-1 β , IL-6, IL-12 und IL-18) und Chemokinen, indem es den Abbau von I κ B reduziert (Lentsch et al., 1997).

8. Ziele und Fragestellungen der Arbeit

Anhand der in der Einleitung vorgestellten Hintergründe kann zunächst aus den folgenden Gründen von einer Rolle für NF-IL6 in der Aktivierung der HPA-Achse ausgegangen werden:

1. Es gibt Hinweise auf eine direkte Verbindung zwischen NF-IL6 und der Freisetzung von CRH aus dem PVN. Dafür spricht beispielsweise der Nachweis der NF-IL6-bedingten Aktivierung des CRH-Promotors (Stephanou et al., 1997).
2. Über die Regulation der sekundären Mediatoren der CRH-Freisetzung (NO und PGE₂) könnte NF-IL6 zusätzlich einen indirekten Einfluss auf diesen Mechanismus haben (Kolyada and Madias, 2001, Chun and Surh, 2004).
3. Die POMC-Expression selbst stellt einen weiteren möglichen Angriffspunkt der Regulation der HPA-Achsen-Aktivierung durch NF-IL6 dar, weil Interaktionen des Transkriptionsfaktors mit dem POMC-Promotor bereits nachgewiesen wurden (Abbud et al., 2004).
4. Die LPS-induzierte NF-IL6-Immunreaktivität in wichtigen Schnittstellen zwischen Immunsystem und endokrinem System im Gehirn sowie die konstitutive und induzierbare NF-IL6-Immunreaktivität in Strukturen, die der HPA-Achse selbst zugeordnet werden können (Sharp et al., 1989, Damm et al., 2011), stellen weitere Hinweise auf die regulatorische Funktion dieses Transkriptionsfaktors im Aktivierungsweg der HPA-Achse dar.

Folglich war das Ziel dieser hier vorliegenden Arbeit, neben der weiteren speziesbezogenen Eingrenzung der bereits beschriebenen Beteiligung von NF-IL6 im Verlauf LPS-bedingter Krankheitssymptome, die Charakterisierung der potenziellen Rolle dieses Transkriptionsfaktors in der HPA-Achsen-Aktivierung.

Dafür sollten folgende Bereiche mit verschiedenen Teilfragestellungen untersucht werden:

A) Charakterisierung der NF-IL6-Immunreaktivität nach einem infektiösen Stimulus (LPS) im Gehirn der Maus

- Welche Regionen des Mäusegehirns zeigen eine NF-IL6-Immunreaktivität?
- Bestehen speziesspezifische Unterschiede zwischen den neu gewonnen Erkenntnissen bei der Maus und den bisher vorhandenen Daten bei der Ratte?

B) Charakterisierung der NF-IL6-Immunreaktivität nach einem infektiösen Stimulus (LPS) in der Hypophyse der Ratte

- ❖ Wird NF-IL6 in der Hypophyse nach LPS-Stimulation aktiviert?
 - In welchen Bereichen (Vorder-, Zwischen- oder Hinterlappen), zu welchen Zeitpunkten sowie mit welcher Dichte und Intensität?
 - In welchen Zellphänotypen der Hypophyse ist die LPS-vermittelte Erhöhung der NF-IL6-Aktivität zu sehen (corticotrope Zellen, Pituizyten, follikulostellare Zellen)?

- Kann anhand einer Colokalisation von NF-IL6 mit zellulären ACTH-Signalen von einer Beteiligung von NF-IL6 an der LPS-stimulierten Synthese bzw. Freisetzung von ACTH aus dem HVL ausgegangen werden?
- Spielt dabei möglicherweise ein Zusammenwirken („cross talk“) von NF-IL6 mit anderen Transkriptionsfaktoren wie STAT3 und NF- κ B eine Rolle?

C) Charakterisierung der NF-IL6-Immunreaktivität nach einem psychologischen Stimulus (Open Field Stress) im Gehirn der Ratte

- ❖ Führt psychologischer Stress zu einer NF-IL6-Aktivierung im Gehirn?
- ❖ Wenn ja:
 - Welche Regionen des Rattengehirns zeigen eine NF-IL6-Aktivierung nach psychologischem Stress?
 - Zu welchem Zeitpunkt besteht die höchste Dichte und Intensität an NF-IL6-Signalen?
 - In welchen Zellen und zu welchen Zeitpunkten ist die stressvermittelte Erhöhung der NF-IL6-Aktivität in der Hypophyse zu sehen?
 - Bestehen Unterschiede bezüglich Gehirnregion, Zeitverlauf oder Zellphänotypen zur LPS-induzierten NF-IL6-Aktivität?
 - Könnten zirkulierende Zytokine wie IL-6 oder TNF- α an der NF-IL6-Aktivierung nach psychologischem Stress beteiligt sein?
 - Kommt es im HVL nach psychologischem Stress zu einem Zusammenspiel („cross talk“) von NF-IL6 mit anderen Transkriptionsfaktoren wie STAT3 und NF- κ B?
 - Gibt es Hinweise auf eine Rolle von NF-IL6 bei der Erhöhung der Körperkerntemperatur nach psychologischem Stress?
- ❖ Welche inflammatorischen Marker werden nach einem psychologischen Stressstimulus im Hypothalamus und in der Hypophyse auf mRNA-Ebene induziert?
 - Lassen sich hieraus funktionelle Rückschlüsse auf die Mechanismen der Erhöhung der Körperkerntemperatur nach psychologischem Stress ableiten?
 - Könnte an der Expression dieser Marker der Transkriptionsfaktors NF-IL6 beteiligt sein?

D) Charakterisierung der Rolle von inflammatorisch bedeutsamen Zytokinen bei der LPS-vermittelten Aktivierung von NF-IL6 in der Hypophyse der Ratte (in vitro)

- ❖ Welche Zytokine sind an der LPS-induzierten NF-IL6-Aktivierung in Zellen des HVL beteiligt?
 - Mögliche Bedeutung von TNF- α , IL1- β und/oder IL-6?
 - In welchem Maße interagieren diese Zytokine und beeinflussen sich gegenseitig bei der NF-IL6-Aktivierung?
- ❖ Stammen die in der Hypophyse agierenden Zytokine von extern oder werden sie in der Hypophyse selbst gebildet?

- Welche Zellen des HVL sind zur Produktion welcher Zytokine befähigt?
 - Welche Rolle spielen die freigesetzten Zytokine an der LPS-stimulierten Synthese bzw. Freisetzung von ACTH aus dem HVL?
 - Beeinflussen sich diese Zytokine gegenseitig bei der LPS-stimulierten Synthese bzw. Freisetzung von ACTH?
- ❖ Welche Signalwege vermitteln die Zytokinwirkungen: Ist die LPS-induzierte NF-IL6-Aktivierung in der Hypophyse (zumindest anteilig) JAK-STAT vermittelt?

E) Charakterisierung der Bedeutung von NF-IL6 bei der Entstehung von zentralnervös kontrollierten Krankheitssymptomen und Fieber anhand von NF-IL6-Knock-out-Mäusen; physiologische Folgen der NF-IL6-Defizienz

- ❖ Wie verändert sich der Phänotyp der Tiere durch die NF-IL6-Defizienz?
- Welchen Einfluss hat der NF-IL6-Knock-out auf die basale Körperkerntemperatur, die basale Futter- und Wasseraufnahme und die lokomotorische Aktivität im Tag/Nacht-Rhythmus?
- ❖ Welche Bedeutung hat NF-IL6 bei der Entstehung von LPS-induziertem Fieber und dem „sickness behavior“?
- Gibt es Hinweise auf eine bereits postulierte Rolle bei der Entstehung und/oder der Beendigung von Fieber und „sickness behavior“?
 - Sind solche Effekte abhängig von der LPS-Dosierung?

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Technische Geräte

Bezeichnung	Typ	Firma
Absaugpumpe	Minni A	Leybold-Heraeus, Hanau
Aqua bidest (dd.) Anlage (Reinstwassersystem)	Milli-Q Biocel	Millipore, Eschborn
Autoklav	Systec 2540 EL	Systec, Wetztenberg
Binokular	Nikon SMZ-V	Nikon, Tokio, Japan
Binokular mit Kamera	SM2-U	Nikon, Düsseldorf
Brutschrank	Nuaire™ US-Autoflow	Nuaire, Plymouth, MN, USA
Dataport	Dietscan Analyser	Accu Scan Instruments Inc., Columbus, OH, USA
Differentialwaage (Futter)	EK200i	A&D Weighing San Jose, USA
Differentialwaage (Wasser)	EW3006	A&D Weighing San Jose, USA
Digitale schwarz-weiß Kamera	Spot Insight	Diagnostic Instr.-Visitron Systems, Puchheim
Eismaschine	Icematic F120	CastelMAC S.p.A. Castelfranco Veneto, Italien
ELISA reader	Digiscan	Asys Hitech, Eugendorf, Österreich
Feinwaage	AE50	Mettler-Toledo, Gießen
Fluoreszenzmikroskop	Olympus BX50	Olympus Optical, Hamburg
Futter-Trinkanlage	Dietscan Analyser	Accuscan Instruments, Columbus, USA
Gel-Dokumentationssystem	Molecular Imager	Bio-Rad, München
Guillotine		Werkstatt Kerkhoff Institut, Bad Nauheim
Heißluftsterilisator	ED 115/E2	Binder GmbH, Tuttlingen
Homogenisator (Ultraschall)	SONOPULS	Bandelin Electronic GmbH & Co KG, Berlin
Käfige für Klimakammer		Campuswerkstatt Veterinärmedizin, Gießen
Klimakammer	10°US/+5 to +40 DU	Firma Weiss Umwelttechnik, Reiskirchen
Kryostat	Typ HM 500	Microm GmbH, Walldorf
Kühlraum		Vissman, Allendorf
Lamina-Flow Arbeitsbank	Herasafe	Kendro Laboratory Product GmbH, Hanau

Mikroflow TM Sicherheitswerkbank Klasse 2	Modell 20229	Nunc, Wiesbaden
Mikroskop	Dialux 22EB	Leitz-Leica, Wetzlar
Mikroskop	HM Lux3	Leitz-Leica, Wetzlar
Minishaker/Vortex	MS1	IKA Works Inc. Wilmington, NC, USA
Molecular Imager [®]	ChemiDoc TM XRS Imaging System	BioRad, München
Perfusionsanlage		Werkstatt Kerkhoff Institut Bad-Nauheim
pH-Meter	765 Calimatic	Kleinfeld Labortechnik, Hannover
pH-Meter	PH537 microprozessor	WTW, Weilheim
Pipettiergerät	Pipetboy	Integra Biosciences GmbH, Fernwald
Pipettierhelfer	Easypet	Eppendorf AG, Hamburg
Power Supply	Power Pac 200	BioRad, München
Schermaschine	Typ GH 004	Aesculap, Tuttlingen
Schüttler	Typ 3011	Roth GmbH, Karlsruhe
Schüttler Rotomix	Type 50800	Barnstead International, Dubuque, IA, USA
Sicherheits-Bunsenbrenner	Fireboy eco	Technomara, Fernwald
Spectrophotometer	DU [®] 50	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
StepOnePlus TM Real-Time PCR System		Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Telemetrie - Dataport (Körpertemperatur)	DP-24 Dataport	Minimitter Company Inc., Sunriver, OR, USA
Telemetrie-Empfängerplatte (30 x 22,5 x 3 cm)	RA -1000	Minimitter Company Inc., Sunriver, OR, USA
Telemetrie-Empfängerplatte (56×29×7 cm)	ER-4000 Receiver	Respironics Inc-MiniMitter, Bend, OR, USA
Telemetrie - Sender (16 x 11mm)	VM-FH TR-3000	Minimitter Company Inc., Sunriver, OR, USA
Telemetrie – Sender (23 x 8mm)	T-4000 E-Mitter [®]	Respironics Inc-MiniMitter, Bend, OR, USA
Thermoblock	QBT	VWR, Darmstadt
Tischrühr- und Heizgerät	Combimag	Roth GmbH, Karlsruhe
Tischrühr- und Heizgerät	PCT Basic	IKA Labortechnik, Staufen
Vortexer	VF2	IKA Labortechnik, Staufen
Vortexgerät	MS1 Minishaker	IKA Labortechnik, Staufen

Vakuumpumpe	XF 54 230 50	Millipore, Eschborn
Waage zum Wiegen der Tiere:	Satorius universal	Sartorius AG, Göttingen
Waagen zum Abwiegen von Trockensubstanzen	P1210N; AE 50 und PM 2500	Mettler Toledo, Gießen
Wärmekissen		Fine Science Tools Inc., Heidelberg
Wärmematte		MarMed GmbH, Cölbe
Wärmematte	TR-100 FST+EA4013	Messmer Elektronik, Dettenhausen
Wärmeschränke	Typ 5050 EK und 5042	Haereus, Hanau
Wärmeblock	Dri-block DB2A	Techne-Bibby- Scientific, Staffordshire, UK
Zelkultur Mikroskop	Flouvert FU	Leitz-Leica, Wetzlar
Zentrifuge	Megafuge 1.0 R	Thermo Scientific Waltham, MA, USA
Zentrifuge	Spectrafuge mini	Neo Lab, Heidelberg
Zentrifuge für 96well Platten	PerfectSpinP	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen

2. Software

Programm	Software
Accudiet 1.20	AccuScan Instruments, Columbus, OH, USA
Adobe Photoshop, Version 5.5	Adobe Systems GmbH, Unterschleißheim
DIETDAT, Version 1.70	AccuScan Instruments, Columbus, OH, USA
Dietmax	AccuScan Instruments, Columbus, OH, USA
EndNote Programm, Version X4	Thomson ISI ResearchSoft, Carlsbad, CA, USA
Graph Pad Prism®, Version 5	GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA
Metamorph, Version 5.05	Diagnostics Instruments – Visitron Systems, Puchheim
Quantitiy One® Software	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
StepOnePlus Software, Version 2.1	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Spot Insight Software	Diagnostics Instruments, Michigan, USA
SIGMA Stat® 3.5	Systat Software, Inc., Point Richmond, CA, USA
Vital View Version 3.1	Respironics Inc–MiniMitter, Bend, OR, USA
Windows Microsoft Excel 2010	Microsoft Corporation, München
Windows Microsoft Word 2010	Microsoft Corporation, München
ChemiDoc™ XRS Imaging System	Biorad München

3. Chemikalien und Substanzen

Bezeichnung	Firma
Actinomycin	Sigma-Aldrich, München
AG490 (N-Benzyl-3,4-dihydroxybenzylidenecyano- acetamide)	Enzo Life Sciences International Inc. (BIOMOL), PA, USA
AG490- Gebrauchslösung (1,5 µg/µl, 5 mM)	1 mg AG490 in 667 ml Cremophor® EL- Gebrauchslösung und Lagerung bei -55°C
B 27	Invitrogen, Darmstadt
Carbogengas	Messer Griesheim GmbH, Neuried
Citifluor	Citifluor LTD, London, UK
Cremophor® EL (Polyoxyethylenglyceroltriricinoleat 35, DAC)	Sigma-Aldrich, München
Cremophor® EL-Gebrauchslösung (25% in PBS)	1ml Cremophor® EL in 1 ml pyrogenfreies PBS, Zugabe von weiteren 3 ml PBS, mischen, Inkubation im Ultraschallwasserbad bei 37°C, 1h
DAPI (4'6-Diamidin-2'Phenylindol Dilaktat)	Mo Bi Tec, Göttingen
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Invitrogen, Darmstadt
Dispase I	Roche Deutschland, Grenzach-Wyhlen
D-Glucose	Sigma-Aldrich, München
Donkeyserum	Biozol, Eching
(EBSS) Earle's Balanced Salt Solution	Invitrogen, Darmstadt
Einbettmedium für Immunhistochemie	Jung, Nussloch
Ethanol	Schmidt, Dillenburg
Fetales Kälberserum (FKS)	PAA, Pasching, Österreich
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, München
Gentamycin	Biochrom, Berlin
Goatserum	Biozol, Eching
(HBSS) Hank's Bufferd Salt Solution	Biochrom, Berlin
HEPES Natriumsalz (N-(2-Hydroxyethyl)- piperazin- N'-(2-ethansulfonsäure)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Interleukin-6 Qualitätskontrollen und Standards	NIBSC, Potters Bar, UK
Isopropanol	Sigma-Aldrich, München
L-Glutamat (Monosodium-Salz)	Sigma-Aldrich, München
L-Glutamin	Biochrom, Berlin
Lipopolysaccharid (E.coli, Serotyp 0111:B4,	Sigma-Aldrich, München

Lot : 030M4114)	
Lipopolysaccharid-Stocklösung (1mg/ml)	Lösen von LPS in PBS und Lagerung bei -20°C
Lipopolysaccharid-Gebrauchslösung (100µg/ml)	Verdünnung der Stocklösung in PBS und Lagerung bei -20°C
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München
MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl] 2,5-Diphenyl-Tetrazolium-bromid)	Sigma-Aldrich, München
PFA (Paraformaldehyd)	Merck, Darmstadt
PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)	PAA, Cölbe
PBS (instant), pH 7,2 - 7,4	Ansatz aus PBS Tabletten in Aqua dd.. (1 Tablette/ 200 ml)
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
Poly-L-Lysin	Biochrom, Berlin
RNase-Zap	Invitrogen, Darmstadt
Steriles Wasser für die Zellkultur	PAA, Pasching, Österreich
Tissue Tec Einbettmedium	Jung, Nussloch
Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) Qualitätskontrollen und Standards	NIBSC, Potters Bar, UK
Tris-HCl	Sigma-Aldrich, München
Triton X-100	Sigma-Aldrich, München
Trypsin	Biochrom, Berlin

4. Medikamente und OP-Bedarf

Handelsname	Wirkstoff	Zweck und Dosierung	Firma
Antisedan®	Atipamezolhydrochlorid	Antagonisierung der Narkose, 1 mg/kg	Pfizer GmbH, Berlin
Vidisic®-Augengel	Carbomer 40000-60000	Schutz vor Austrocknung der Hornhaut bei OP	Dr. Mann Pharma, Bausch & Lomb, Berlin
Braunol®	Povidon-Iod Lösung	Haut- und Schleimhautantiseptik	B. Braun, Melsungen
Cepetor® KH	Medetomidin	Narkose, 0,25 mg/kg KGW	cp-pharma GmbH Burgdorf,
Cutasept®	2-Propanol-Benzalkoniumchlorid	Hautantiseptikum	Bode, Hamburg
Einmalkanülen, steril		Injektionen	B. Braun, Melsungen

Einmalskalpelle, steril		OP	B. Braun, Melsungen
Heparin-Natrium- 250000- ratiopharm®	Heparin-Natrium 250000 I.E./10 ml	Antikoagulation	Ratiopharm, Ulm
Wundnahtmaterial	Polyester (nicht- resorbierbar, USP 3/0) Surgicryl (resorbierbar, USP 3/0)	Wundverschluss	SMI, St. Vith, Belgien
Ketamin® 10%	Ketaminhydrochlorid	Narkose, 60 mg/kg KGW	Belapharm, Vechta
Metacam® Injektionslösung, 5mg/kg	Meloxicam	Analgesie, 2 mg/kg KKW	Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim
Narcoren®	Pentobarbital-Natrium	Euthanasie, 500- 800mg/kg KGW	Merial, Halbermoos
Operationsbesteck		OP	Aesculap, Tuttlingen
Vetranquil 1%	Acepromazin	Narkose, 0,5 mg/kg	Albrecht GmbH, Aulendorf
Xylazin 2%	Xylazinhydrochlorid	Narkose, 5 mg/kg	cp-pharma GmbH, Burgdorf

5. Antikörper

5.1. Primärantikörper

Antigen	Tierart („host“)	Verdünnung und Anteil Triton X 100	Katalog Nr. und Firma
NF-IL6	„rabbit“, polyklonal IgG	1: 9000; 0,3 %	sc-150 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
NF-IL6	“goat”, polyklonal IgG	1: 250; 0 %	sc-150-G Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
STAT3	“rabbit”, polyklonal IgG	1: 8000; 0,1 %	sc-21876 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
NFκB	“goat”, polyklonal IgG	1: 500; 0,3 %	sc-372 Santa Cruz

			Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
vWF	“sheep”, polyklonal IgG	1: 2000; 0,3 %	SARTW-IG, Affinity Biologicals, Ancaster, Ontario, Canada
GFAP	“mouse”, polyklonal IgG	1: 2000; 0,3%	MAB3402; Millipore, Billerica, MA, USA
CD68 (ED1)	“mouse”, monoklonal IgG	1: 500; 0,3 %	MCA341R; AbD Serotec; Oxford, UK
CD163 (ED2)	“mouse”, monoklonal IgG	1: 500; 0,3 %	MCA342R; AbD Serotec; Oxford, UK
NOS1	„mouse“ polyklonal IgG	1: 500; 0,3 %	sc-648; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
ACTH (1-24)	„rabbit“, polyklonal IgG	1: 2000; 0,3 %	Gabe von Dr. Blähser, JLU Giessen (Blähser, 1988)
TNF- α	„goat“, polyklonal IgG	1:200; 0,05 %	Cat. AF-510-NA R&D Systems, MN, USA
Il-1 β	„goat“, polyklonal IgG	1:1000; 0,05 %	Cat. AF-501-NA R&D Systems, MN, USA
Anti-S100	„rabbit“, polyklonal IgG	1: 250; 0,1 %	Cat. S2644 Sigma-Aldrich, München

5.2. Sekundärantikörper

Name und Exzitationsmaximum	„host“	Gegen Spezies	Verdünnung	Katalog-Nr. und Firma
Alexa Flour® 488 (495nm)	„donkey“ IgG	„mouse“	1:500	AZA21202, MoBiTec GmbH, Göttingen
		„goat“	1:500	AZA11055, MoBiTec GmbH, Göttingen
		„sheep“	1:500	AZA11015,

				MoBiTec GmbH, Göttingen
		„rabbit“	1:500	AZA21206, MoBiTec GmbH, Göttingen
Cy TM 3 (550nm)	„donkey“ IgG	„goat“	1:250 x 2	cat. 705-165-147, Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA
		„rabbit“	1:250 x 2	cat. 711-165-152, Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA

6. Ge- und Verbrauchsmaterialien

6.1. Allgemein

Bezeichnung	Typ	Firma
Glasflaschen	verschiedene Volumina	Schott AG, Mainz
Magnetrührstäbchen	PTFE ummantelt	Roth GmbH, Karlsruhe
Messkolben	Klasse A, 1, 2 und 5 l	Roth GmbH, Karlsruhe
Messzylinder	Klasse A, 100 und 250 ml	Roth GmbH, Karlsruhe
Pipetten	verschiedene Größen	Eppendorf AG, Hamburg
Reaktionsgefäßständer		Roth GmbH, Karlsruhe
Einmalhandschuhe	aus Latex	UNIGLOVES [®] GmbH, Troisdorf
Einmalhandschuhe N-Dex [®]	aus Nitril	Best Manufacturing Company, Menlo GA, USA
Labortücher	Kimtech Science	Kimberley-Clark Europe Limited, Reigate, England
Parafilm [®]		Roth Laborbedarf, Karlsruhe
Pasteur- Pipetten		MAGV, Rabenau
Pipettenspitzen	10, 100, 1000µl	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich

Pipettenspitzen mit Filter	10, 100, 1000µl	Fa Eppendorf-Natheler - Hinz-GmbH, Hamburg
PS- Röhrchen	steril, 3; 5; 12; 15; 50 ml	Greiner Bio- One GmbH, Frickenhausen
Safe-Lock Tubes	Reaktionsgefäße , 0,5; 1,5; 2 ml	Fa Eppendorf-Natheler - Hinz-GmbH, Hamburg
Serologische Pipetten	steril: 2; 5;10; 25; 50 ml	Sarstedt AG&Co, Nümbrecht
Skalpellklingen	BB522	Aesculap-Werke AG, Tuttlingen

6.2. Tierhaltung

Bezeichnung	Firma
Einstreu Ratten (SS14-H1505-219)	Sniff, Soest
Einstreu Mäuse („bedding“, FS 14) (H1505-29)	Sniff, Soest
Futterbeh�lter	institutseigene Herstellung
Filter für Deckel M�usek�fige	Ehret Labor- und Pharmatechnik, Emmerdingen
Mäuse Polycarbonatk�fige Typ III	Ehret Labor- und Pharmatechnik, Emmerdingen
Kohlenstoffdioxidflasche	Messer Griesheim GmbH, Neuried
M�usefutter Zuchtpellets (M-Z, extrudiert) (V1126-000)	Sniff, Soest
Messk�fig mit Deckel 30 x 24 x 22,5 cm (L x H x B)	Werkstatt Kerckhoff-Institut, Bad Nauheim
Nestlets Mäuse	Sniff, Soest
Ratten Polycarbonatk�fige Typ III	Ehret Labor- und Pharmatechnik, Emmerdingen
Ratten Polycarbonatk�fige Typ IV	Ehret Labor- und Pharmatechnik, Emmerdingen
Maus-Tunnel für die Versuche. rot	Ehret Labor- und Pharmatechnik, Emmerdingen
Maushaus für die Zucht, rot	Ehret Labor- und Pharmatechnik, Emmerdingen
Sauerstoffflasche	Messer Griesheim GmbH, Neuried
Standard-Rattenfutter (R-Z V1324-000)	Sniff, Soest
Waagschale für Tiere	institutseigene Herstellung
Wasserflaschen mit Tr�nkenippel Ratten	Ehret Labor- und Pharmatechnik, Emmerdingen
Wasserflaschen mit Tr�nkenippel Mäuse	Ehret Labor- und Pharmatechnik,

	Emmerdingen
--	-------------

6.3. Immunhistochemie und Immunzytochemie

Bezeichnung	Typ	Firma
Alufolie		Roth GmbH, Karlsruhe
Deckgläschen	24 x 50 mm und 24 x 60 mm, Stärke 1	Menzel GmbH, Braunschweig
Einmalkanülen Sterican®	0,9 x 40 mm, 0,45 x 12 mm, 0,4 x 20 mm	Braun Melsungen AG, Melsungen
Einwegspritzen		BD Plastipak, Becton- Dickinson, Heidelberg
Faltenfilter 604	1/2 (Ø 240 mm)	Schleicher und Schuell GmbH, Dassel
Fettstift	Papp-Pen®	G. Kisker, Steinfurt
Inkubationskästen mit Deckel	20 x 30 x 5 cm	Biochem Instrumente GmbH, Weilburg
Klebeband	Silkafix® 2,5 cm x 9,2 m	Lohmann Rauscher International GmbH & Co.KG, Rengsdorf
Multi-Wellplatten	12-fach	MAGV, Rabenau
Objektträger	76 x 26 mm	Menzel GmbH & Co.KG, Braunschweig
Objektträgermappen	für 20 OT	LAT-Labor- und Analysen- Technik GmbH, Garbsen
Parafilm®		Roth GmbH, Karlsruhe
pH-Indikatorpapier		Merck, Darmstadt
Pinzel	Rotmarderhaar	Renensis, Flensburg
Rasierklingen	752/1/SS	Campden Instruments Limited, Loughborough, UK
Reaktionsgefäße	0,5; 1,5; 2 und 5 ml	Eppendorf AG, Hamburg
serologische Pipetten	1; 5; 10 und 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht

6.4. Zellkultur

Bezeichnung	Typ	Firma
CELLocate®		Eppendorf
Deckgläschen	15 x 15mm Stärke 1	Menzel GmbH, Braunschweig
Einwegspritzen	10 ml	B. Braun, Melsungen

Falconröhrchen	15 und 50ml	Sarstedt, Nümbrecht
Filterpapier	Ø 10cm	Macherey-Nagel, Düren
Flexiperm®	Mikro-12 Kammersysteme	Haereus, Hanau
Kim-Wipes	Fusselfreie Tücher	Kimberley-Clark, Mainz
Neubauer-Zählkammer		Brand, Wertheim
Pasteurpipetten	230 mm aus Glas	MAGV, Rabenau
Petrischale (Glas)	Ø 11 cm	MAGV, Rabenau
Petrischalen (Plastik)	94/16 mm	Sarstedt, Nümbrecht
Präparationsbesteck		Aesculap-B.Braun, Tuttlingen
Röhrchen, steril	15 und 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Sterilfilter	FP 30/0, 2 CA-S	Schleicher und Schuell GmbH, Dassel
Sterile Einmalpipetten	1; 5; 10; 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Sterile Glaspasteurpipetten		Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Sterilfilter		Whatman, Dassel
Teflonschläuche	Innendurchmesser 0,75- und 1,98 mm	Kronlab, Sinsheim

6.5. Genotypisierung und Gel-Elektrophorese

Bezeichnung	Typ	Firma
Qiagen Kit DNeasy Blood and Tissue		Qiagen GmbH, Hilden
Röhrchen, steril	15 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Pipetten	10; 500; 1000; 2500 µl	Eppendorf, Eppendorf
Reaktionsgefäße	2 ml	Brand, Wertheim
Gelkammer		Biorad, München
Gelkämme		Biorad, München
Geltrocknungsrahmen		Roth, Karlsruhe

6.6. Quantitative Real-Time-PCR

Bezeichnung	Firma
MicroAMP™ 96-Well Support Base	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
MicroAmp(R) Fast 8-Tube Strip 0.1 ml	
MicroAmp(R) Fast 96-Well Reaction Plate 0.1 ml	
MicroAMP™ 96- Well Tray for VeriFlex™ Blocks	
MicroAMP™ optical 96-Well Reaction Plate	

Mikro Küvette (45 mm x 12,5 mm x 12,5 mm; Schichtdicke 10 mm) aus Quarzglas Suprasil®	Hellma Analytics, Mühlheim
Optical Adhesive Cover	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Optical Flat Cap 8 / strip	
5 x First Strand Buffer: 250 mM Tris-HCl (pH 8,3 bei RT) 375 mM KCl 15 mM MgCl ₂	Invitrogen, San Diego, CA, USA
Chloroform	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Deoxynucleotide (dNTP) Mix; 10 mM	
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	
DTT (Dithiothreitol) 0,1 M	Invitrogen, San Diego, CA, USA
Ethanol absolut	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Isopropanol	
M-MLV Reverse Transcriptase; 200 U/μl	Invitrogen, San Diego, CA, USA
Random Hexamers (Random primers); 50 μM in 10 mM Tris-HCl; pH 8,3	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
RNase ZAP®	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
TaqMan® Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
TRIzol	Invitrogen, San Diego, CA, USA

6.7. TNF-α und IL-6 Bioassays

Bezeichnung	Typ	Firma
Zellkulturflaschen	steril mit Filter: 50; 75; 250 und 550 ml	Greiner Bio- One GmbH, Frickenhausen
Gewebekulturplatten	steril, mit Abdeckplatte, 96 K	Greiner Bio- One GmbH, Frickenhausen
Heparin-Natrium 250000 Ratiopharm®	Heparin-Natrium	Ratiopharm GmbH, Ulm

7. In vivo Versuche

7.1. Versuchstiere

7.1.1. Ratten

7.1.1.1. Haltung und Handling

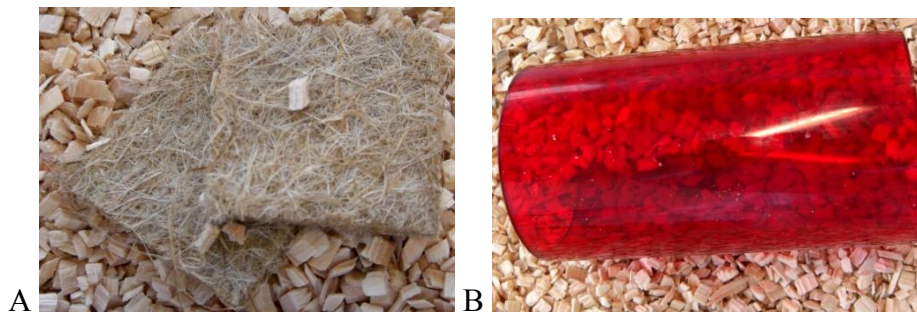
Für die Open Field Stress Versuche sowie für die primäre Zellkultur des HVL wurden Wistar-Ratten (*Rattus spec.*) aus der institutseigenen Zucht verwendet. Die Elterntiere wurden von Charles River WIGA (Sulzfeld) bezogen. Die Tiere wurden bei einer konstanten Raumtemperatur von $23 \pm 1^\circ\text{C}$, einer relativen Luftfeuchte von 50% und mit einem 12/12 Stunden hell/dunkel Rhythmus (Licht von 7:00 bis 19:00 Uhr) gehalten. Als Futter verwendete man Rattenzuchtfutter der Firma ssniff Spezialdiäten GmbH, welche auch die verwendete Einstreu lieferte. Das Futter und das Wasser standen den Tieren immer *ad libitum* zur Verfügung. Die im Institut geborenen Jungtiere wurden mit dem Muttertier in transparenten Polycarbonat-Käfigen Typ IV (38 x 59 x 18 cm/B x T x H) aufgezogen. Nach Erreichen des Absetzgewichtes von 110 ± 10 g Körpermasse wurden bis zu fünf Jungtiere (getrennt nach Geschlecht) in Polycarbonat-Käfige Typ III umgesetzt, wo sie unter identischen Haltungsbedingungen bis zum Beginn der Versuche verblieben. Die für die Open Field Stress Versuche verwendeten männlichen Ratten mit einem Alter von 12 Wochen hatten ein Operationsgewicht von 200 ± 50 g. Die für die primäre Zellkultur des HVL verwendeten männlichen Ratten mit einem Alter von 12-14 Wochen, hatten vor der Dekapitation mittels Guillotine ein Gewicht von 250 ± 50 g.

Vor dem Beginn der Studie wurden beim Regierungspräsidium (RP) Hessen die durchzuführenden Tierversuche genehmigt (Projektnummer GI 18/2 51/2008) bzw. angezeigt (V54-19, c20/15c GI18/2).

7.1.2. Die NF-IL6-Knock-out-Mäuse

7.1.2.1. Haltung und Handling

Zur Unterbringung der NF-IL6-Knock-out-Mäuse und der Sentinel-Mäuse verwendete man transparente Polycarbonatkäfige Typ III, welche mit Einstreu der Firma Sniff Spezialdiäten GmbH versehen waren. Das Zuchtfutter der Firma Sniff (Extrudat V1125) und Wasser standen den Tieren immer *ad libitum* zur Verfügung. Auch bei diesen Tieren wurde ein künstliches Beleuchtungsprotokoll (Licht von 7:00 bis 19:00 Uhr) angewendet. Die relative Luftfeuchte lag bei $50 \pm 5\%$ und die Umgebungstemperatur bei $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Als “environmental enrichment“ wurden Nestlets als Schlafplatz und rote Häuschen bzw. rote Röhren aus Plastik (Ehret Labor- und Pharmatechnik, Emmerdingen) als Rückzugsort für die Tiere bereitgestellt (Abbildung 7-1). Die Tierversuche wurden vor Versuchsbeginn beim RP Hessen genehmigt (Projektnummer GI 18/2 51/2008).

**Abbildung 7-1**

„Environmental Enrichment“: (A) Nestlets und (B) rote Röhren in den Mäusekäfigen.

7.1.3. Aufbau und Grundlagen der institutseigenen Zucht der homozygoten NF-IL6-Knock-out-Mäuse

Die Zucht der homozygoten NF-IL6-Knock-out-Mäuse erfolgte durchgehend durch die Verpaarung von heterozygoten Elterntieren (STOCK Cebp^{btm1Vpo}/J; Stock Number: 006873 (<http://www.jax.org>). Die Grundlage der Zucht bildeten vier weibliche und zwei männliche Mäuse im Alter von vier bis sechs Wochen, die im Januar 2010 aus den Jackson, Laboratory, Maine, USA importiert wurden. Eine Woche nach Ankunft der Mäuse im Institut für Veterinär-Physiologie und -Biochemie und somit nach Ablauf der Erholungs- und Eingewöhnungsphase wurden jeweils zwei weibliche und ein männliches Tier in einem Käfig zusammengesetzt („mating trio“). Ziel dieser Kombination war es den Platz im Käfig und die gegenseitige Hilfe der weiblichen Mäuse beim Aufziehen des Nachwuchses optimal zu nutzen. Die Weibchen erreichen die Geschlechtsreife mit einem Alter von 30 Tagen und die Böcke mit einem Alter von 30 bis 35 Tagen.

Zucht-Schema: Heterozygot Mutant(-/+) x Heterozygot Mutant(-/+)

Die Nachkommen dieses Verpaarungsschemas sind in der Theorie zu 12 bis 25% homozygot Mutant, zu 50% heterozygot Mutant und zu 25% Wildtypen. Die Wildtyp-Mäuse wurden als Kontrolltiere in den Versuchen genutzt und die heterozygoten Nachkommen in der Zucht eingesetzt. Nach einer Trächtigkeitsphase von ca. 21 Tagen wurden je nach Verpaarung mindestens zwei bis maximal sieben Junge geboren. Kurz vor der Geburt der Nachkommen wurde das männliche Tier aus dem Käfig genommen und für einen weiteren Zuchteinsatz mit weiteren weiblichen Mäusen eingesetzt. Das Konzept des „mating trio“ musste in dieser Form variiert werden, da die Männchen bei diesen Tieren den Zuchterfolg negativ beeinflussten. Die Nachkommen wurden im Alter von drei Wochen abgesetzt, nach Geschlecht getrennt und in einen anderen Käfig umgesetzt, wo sie unter identischen Haltungsbedingungen bis zur weiteren Nutzung verblieben. Des Weiteren wurden im Alter von drei Wochen eine Markierung zur eindeutigen Identifizierung mittels Ohrmarke sowie eine gleichzeitige Probenentnahme für die Genotypisierung mittels Ohrstanze durchgeführt. Sowohl die weiblichen als auch die männlichen, heterozygoten Zuchtmäuse waren maximal neun Monate im Zuchteinsatz. Die in der institutseigenen Zucht geborenen, homozygoten Knock-out-Mäuse wurden zunächst mit einer dreistelligen gelaserten Nummer (Kent Scientific

Corporation) eindeutig gekennzeichnet und durch die Untersuchung der Ohrstanzbiopsien genotypisiert. Die Mäuse wurden im Alter von zwei bis drei Monaten für die geplanten Versuche verwendet. Der Phänotyp der homozygoten Knock-out-Mäuse unterschied sich von den Wildtyp-Tieren (Abbildung 7-2) durch eine geringere Körpergröße, ein geringeres Körpergewicht (bis zu 10 g Unterschied bei gleichem Alter), Veränderungen an den Augen (siehe Kapitel 19.1) und durch ein struppigeres, helleres Fell (Abbildung 7-3). Unveränderte Wildtyp-Geschwistertiere vom gleichen Stamm wurden als respektive Kontrolle zu den homozygoten NF-IL6-Knock-out-Mäusen verwendet, da sie den gleichen genetischen Hintergrund aufweisen.

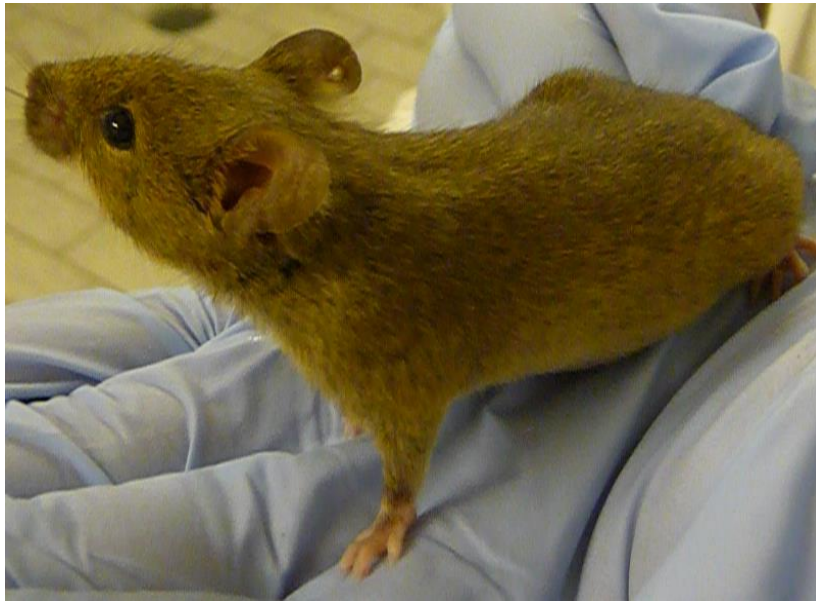


Abbildung 7-2
Männliche, drei Monate alte Wildtyp-Maus.

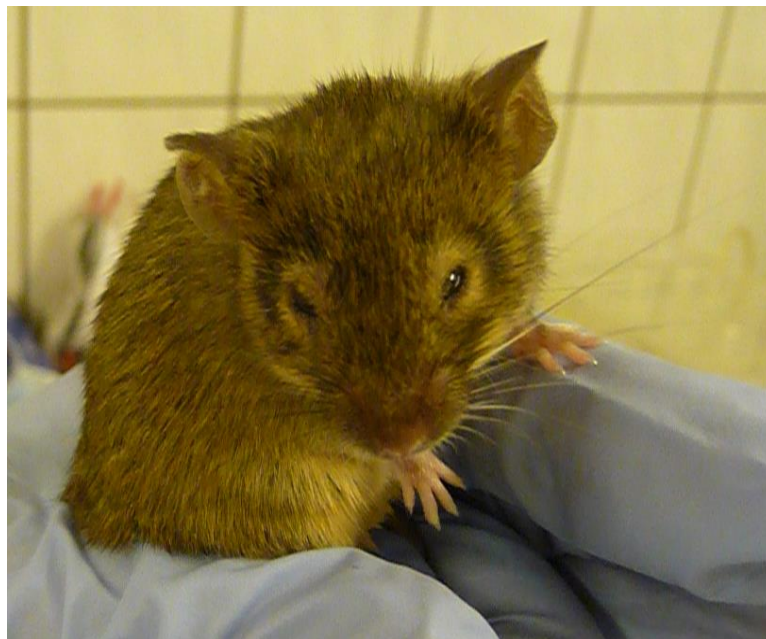


Abbildung 7-3
Männliche, drei Monate alte homozygote NF-IL6-Knock-out-Maus.

7.1.4. Erhöhte neonatale Sterblichkeit in der Zucht

Wie erwartet trat in der institutseigenen Zucht von Beginn an eine um 50% erhöhte neonatale Sterblichkeit bei allen Nachkommen auf (Akira, 1997). Die heterozygoten Muttertiere vernachlässigten teilweise ihren Nachwuchs. Auch Kannibalismus kurz nach der Geburt wurde beobachtet. In früheren Studien war bereits beschrieben worden, dass die homozygoten Tiere an einer defekten Gluconeogenese, defekten Adipogenese und gestörter Thermoregulation leiden (Carmona et al., 2005) und es bereits intrauterin zum Tod der Tiere kommen kann (Akira, 1997, Li et al., 2007) (Kapitel 5.3.7). Nachkommen, die die Geburt überleben besitzen eine eingeschränkte Fähigkeit Glucose zu mobilisieren. Folglich besteht ein erhöhtes Risiko, dass solche Tiere an einer Hypoglykämie sterben (Wang et al., 1995, Croniger et al., 1997, Liu et al., 1999).

7.1.5. Ammenaufzucht

Um die erhöhte neonatale Sterblichkeit reduzieren zu können, wurden weibliche Sentinel-Tiere (CD1-Mäuse), wenn möglich und notwendig als Ammenmütter verwendet. Dazu wurden diese zeitgleich zu den heterozygoten Mäusen mit einer männlichen Sentinel-Maus zusammengesetzt, um eine Synchronisation (± 2 Tage) der Geburt beider Mäusestämme zu erreichen. Direkt nach der Geburt wurden die Nachkommen der heterozygoten Elterntiere mit der Einstreu des Sentinelkäfigs abgerieben und sofort zum übrigen Wurf dazugelegt. Dieses Verfahren wurde erfolgreich in das Zuchtmanagement des Institutes integriert und erzielte eine deutliche Reduktion der neonatalen Sterblichkeit. Die Ammenmütter wurden nach der Übertragung des fremden Nachwuchses für 24 h nicht mehr gestört, erst dann erfolgte eine Kontrolle auf erfolgreiche Adoption. Aufgrund der Tatsache, dass die Sentinel-Tiere eine weiße und die NF-IL6-Knock-out-Tiere eine bräunlich-schwarze Fellfarbe besitzen, war eine eindeutige Unterscheidung der Nachkommen gewährleistet.

7.1.6. Sentinel-Tiere

Die Sentinel-Mäuse (CD1 Stamm) fungierten als „Indikatortiere“ der optimalen Haltungsbedingungen für die Zucht mit den NF-IL6-Knock-out-Mäusen. Zwei männliche und zwei weibliche Mäuse (im Alter von sechs bis acht Wochen) wurden von Charles River bezogen und unter exakt den gleichen Bedingungen wie die heterozygoten Zuchttiere im S1-Zucht- und Haltungsraum des Institutes zur Zucht verwendet. Sie wurden als Ammenmütter und für die FELASA-Untersuchungen eingesetzt. Diese Mäuse bekamen einmal im Monat die Einstreu des NF-IL6-Knock-out-Mäusestammes in den Käfig übertragen. In regelmäßigen Abständen von drei Monaten wurden jeweils zwei männliche Sentinel-Tiere getötet und zur Untersuchung nach den Richtlinien der FELASA-Working Group eingeschickt („Recommendations for the health monitoring of rodent and rabbit colonies in breeding and experimental units“) (Nicklas et al., 2010, Guillen, 2012) (Abbildung 7-4).



Abbildung 7-4

Benötigte Materialien für die Untersuchung einer Sentinel-Maus nach FELASA-Richtlinien: Hautdesinfektionsmittel Cutasept®, autoklaviertes OP-Besteck, sterile Spritzen und Kanülen, ein SAF („sodium acetate-acetic acid-formaldehyd“-)-Röhrchen zur Kotuntersuchung, 2 ml Eppendorf Tubes, Petrischalen, sterile Tupfer und ein Behälter mit 4%igem PFA.

7.1.6.1. Untersuchungsmaterial

Für eine serologische Untersuchung des Blutplasmas der Sentinel-Tiere durch die Firma MfD Diagnostics GmbH (Wendelsheim) wurde direkt nach dem Tod der Tiere mittels CO₂-Betäubung und zervikaler Dislokation Blut aus der *Vena cava* bzw. dem Herzen entnommen, welches dann 10 Minuten bei 8000 rpm zentrifugiert wurde. Des Weiteren wurden in einem Untersuchungsintervall von 12 Monaten Kotballen der Sentinel-Mäuse direkt aus dem Käfig entnommen und zur molekularbiologischen Untersuchung auf *Helicobacter billis* und *hepaticus* genutzt. Für die mikrobiologische Untersuchung wurden mittels Tupfer Probenmaterial aus dem *Präputium*, der *Trachea* und dem *Caecum* entnommen. Während den für die vorliegende Arbeit wichtigen Zeiträumen, wurden bei allen durchgeführten Kontrolluntersuchungen lediglich geringe Keimgehalte verschiedener Schleimhaut- bzw. Darmkommensalen ermittelt. Es konnten weder Salmonellen noch ein anaerobes Bakterienwachstum nachgewiesen werden. Die Untersuchung erfolgte im Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere der JLU Gießen. Für die parasitologische Untersuchung wurde zum einen Kot aus dem *Caecum* des Tieres in einem 2 ml Eppendorf Tube gesammelt und zum anderen Kot aus dem Dünndarm in ein Röhrchen mit SAF-Lösung („sodium acetate-acetic acid-formaldehyd“) verbracht (das SAF-Verfahren wird zur Fixierung und Anreicherung von Parasitenstadien verwendet). Das *Caecum* selbst wurde entnommen und in einem 2 ml Eppendorf Tube eingeschickt. In keiner der durchgeführten Kontrolluntersuchungen konnten Parasiten oder Parasitenstadien durch makroskopische bzw. mikroskopische Untersuchung oder das SAF-Verfahren nachgewiesen werden. Die

Untersuchung erfolgte durch das Institut für Parasitologie der JLU Gießen. Der gesamte Mäusekörper wurde in 4%igem Paraformaldehyd fixiert, um im Institut für Pathologie der JLU Gießen untersucht zu werden. Dort wurden Leber, Lunge, Milz, Nieren, Herz, Gehirn, Knochenmark und der restliche Teil des Darms sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch untersucht. In keiner durchgeführten Kontrolluntersuchung konnten pathologisch-anatomische Abweichungen oder Hinweise auf eine Infektion mit *Streptobacillus moniliformis* oder *Clostridium piliformis* festgestellt werden. Lediglich in Einzelfällen konnte eine tötungsbedingte Stauung in Lunge, Leber, Milz und Niere beobachtet werden.

Serologie	Erreger	Methode	Untersuchungsintervall
	<i>Clostridium piliformes</i>	ELISA	3 Monate
	EDIM	ELISA	3 Monate
	GD-VII (Theiler's Murine)	ELISA	3 Monate
	MHV	ELISA	3 Monate
	MPV	ELISA	3 Monate
	MVM	ELISA	3 Monate
	<i>Mycoplasma pulmonis</i>	ELISA	3 Monate
	PVM	ELISA	3 Monate
	Sendai Virus	ELISA	3 Monate

Tabelle 7-1

Übersicht über die mittels Serologie zu untersuchenden Krankheitserreger der Maus und die einzuhaltenden Untersuchungsintervalle.

EDIM (= „epizootic diarrhea of infant mice“; Rotavirus); „Theiler's murine encephalomyelitis virus“ (TMEV) GD-VII Untergruppe; MHV (= Maus Hepatitis Virus); MPV (= Maus Parvovirus); MVM (= Maus Minute Virus); PVM (= Pneumonie Virus der Maus); Sendai Virus (= murines Parainfluenzavirus 1).

Molekularbiologie	Erreger	Methode	Untersuchungsintervall
	<i>Helicobacter billis</i>	PCR	12 Monate
	<i>Helicobacter hepaticus</i>	PCR	12 Monate
	<i>Helicobacter muridarum</i>	PCR	12 Monate
	<i>Helicobacter rodentium</i>	PCR	12 Monate
	<i>Helicobacter typhlonius</i>	PCR	12 Monate

Tabelle 7-2

Übersicht über die mittels PCR zu untersuchenden Erreger und die einzuhaltenden Untersuchungsintervalle.

Mikrobiologische Untersuchung	<i>Trachea</i>	<i>Präputium</i>	<i>Caecum</i>
	y-hämolysierende Streptokokken	y-hämolysierende Streptokokken	y-hämolysierende Streptokokken
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
		<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>
			α-hämolysierende Streptokokken
			<i>Lactobacillus sp.</i>

Tabelle 7-3

Übersicht über die mikrobiologisch nachweisbaren und zu untersuchenden Erreger.

7.1.7. Probengewinnung für die Genotypisierung im Mäusestall (S1-Bereich)

Vor der Durchführung der Genotypisierung wurde ein nur für diesen Zweck vorgesehenes Besteck (bestehend aus einer anatomischen und chirurgischen Pinzette sowie einem Ohrclip) autoklaviert. Die Probenentnahme wurde im Zuchtraum durchgeführt. Die zu untersuchenden Jungtiere wurden nacheinander aus ihrem Käfig entnommen und von einer Person fixiert. Die zweite Person entnahm mittels Ohrclip (B.Y.T. & Co., Bay City, Michigan, USA) (Abbildung 7-5) eine 2 mm große Gewebeprobe aus dem linken Ohr der Maus, welche sofort in ein gekennzeichnetes, steriles 1,5 ml Eppendorf Tube verbracht wurde. Falls die DNA-Isolation nicht direkt am gleichen Tag erfolgte, wurden die Proben bei -54°C gelagert. Als nächstes wurde eine Ohrmarke mit einer dreistelligen, gelaserten Nummer in das rechte Ohr der Maus angebracht. Zwischen den einzelnen Tieren wurden das Besteck und der Ohrclips gereinigt und mit 70%igem Alkohol desinfiziert, um eine Kreuzkontamination der Ohrstanzproben auszuschließen.



Abbildung 7-5

Der Ohrclip mit welchem die Gewebeprobe aus dem Ohr der Mäuse entnommen wurden.

7.1.8. DNA-Extraktion aus dem Ohrstanzgewebe

<http://www.qiagen.com/products/genomicdnastabilizationpurification/dneasytissuesystem/dneasybloodtissuekit.aspx#Tabs=t0> (Extraktionskit von Qiagen)

Das Ohrstanzgewebe von 2 mm Länge wurde in ein 1,5 ml Eppendorf Tube gegeben und mit 180 µl des ATL Puffers versetzt. Zusätzlich wurden 20 µl Proteinase K hinzugegeben und anschließend gevortext. Zur vollständigen Lyse des Ohrstanzgewebes wurde die Probe bei 57°C für zwei Stunden in einen Heizblock gestellt. Im Anschluss daran wurde die entstandene homogene Masse für 15 Sekunden gevortext und zuerst 200 µl des AL Puffers, daraufhin 200 µl des 100%igen Ethanol hinzugefügt. Diese Mixtur wurde in ein speziell dafür vorgesehenes „Mini spin column“ mit einem darunter gesetzten 2 ml „Collection Tube“ pipettiert und bei 8000 rpm für eine Minute zentrifugiert. Das durch eine spezielle Filtermembran gedrückte Filtrat wird verworfen und der Filter wird in ein neues Collection Tube eingesetzt. Dadurch werden Kontaminationen und Enzyminhibitoren entfernt. Durch Zentrifugieren für eine Minute bei 8000 rpm erfolgte eine erste Bindung des DNA-Materials an die Membran. Der Überstand und das Tube wurden entsorgt und die Filtereinheit in ein neues steriles Tube eingesetzt. Im nächsten Schritt wurde mit 500 µl AW 1 Puffer das an die Membran gebundene Material gereinigt und nach der Zentrifugation bei 8000 rpm für drei Minuten wurde das Filtrat erneut verworfen und die Filtereinheit wieder in ein frisches steriles Tube eingesetzt. Daraufhin wurden 500 µl des AW 2 Puffers hinzupipettiert und bei 14000 rpm für drei Minuten zentrifugiert, um die spezielle Membran zu trocknen und um jegliche Reste an Ethanol und somit eine Störung der folgenden Schritte zu vermeiden. Nun war es ganz entscheidend, dass nach der Zentrifugation das Filtrat nicht mehr mit dem Probenmaterial an der Membran in Berührung kommt. In einem letzten Schritt wurde die Membran in ein steriles 2 ml Eppendorf Tube eingesetzt und 200 µl des Elutionspuffers direkt auf die Membran gegeben. Nach einer Inkubationszeit von einer Minute erfolgt die Zentrifugation bei 8000 rpm für eine Minute um das gebundene und gereinigte DNA-Material von der Membran zu waschen. Mit dem Elutionspuffer wird schließlich das Material gelöst und in dem Puffer in das Eppendorf Tube gespült. Dieses DNA-Material konnte nun in der PCR eingesetzt werden.

Arbeitsschritt	Zweck	Zeit
Hinzufügen von 180 µl ATL Puffer zu jeder Probe (Ohrstanzgewebe)	Lösen des Gewebeverbandes, Öffnen der Zellstrukturen und Entlassen der DNA aus dem Zellkern	10 s
Hinzufügen von 20 µl Proteinase K		
Vorsichtiges vortexen		
Inkubation im Heizblock bei 56°C		2 h
Vortexen	Durchmischen	15 s
Hinzufügen von 200 µl AL Puffer zu jeder Probe		

Vortexen	Durchmischen	10 s
Hinzufügen von 200 µl Ethanol (96-100%)	Ausfällen der DNA	
Vortexen	Durchmischen	10 s
Überführen der Mischung in ein DNeasy „Mini spin column“ mit darunter gesetzten 2 ml Eppendorf Tube, Zentrifugation bei 8000 rpm, Verwerfen des Filtrats, Einsetzen des „Mini spin column“ in ein neues 2 ml Eppendorf Tube	Filtration, Entfernen von Kontaminationen und Enzyminhibitoren	60 s
Hinzufügen von 500 µl AW1 Puffer zu jeder Probe, Zentrifugation bei 6000 rpm, Verwerfen des Filtrats, Einsetzen des „Mini spin column“ in ein neues 2ml Eppendorf Tube	Binden des isolierten DNA-Materials an die Spezialmembran des Filters	60 s
Hinzufügen von 500 µl AW2 Puffer zu jeder Probe, Zentrifugation bei 14000 rpm, Verwerfen des Filtrats, Einsetzen des „Mini spin column“ in ein neues 2 ml Eppendorf Tube		3 min
Hinzufügen von 200 µl AE Puffer zu jeder Probe, Inkubation bei RT für 1 min. Zentrifugation bei 6000 rpm	Gereinigtes DNA-Material wird von der Membran in das Eppendorf Tube gespült	1 min

Tabelle 7-4

Protokoll der DNA-Isolierung aus dem Ohrstanzgewebe der Maus mittels kommerziellen Kits der Firma Qiagen.

7.1.9. Amplifikation der isolierten Mäuse-DNA mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

7.1.9.1. Allgemeine Grundlagen der PCR

7.1.9.1.1. Verwendete Primer und Zusammensetzung des Master Mixes

Primer	Sequenz	Größe
NF-IL6 mouse Wildtyp (FW)	AAGACGGTGGACAAGCTGAG	263bp
NF-IL6 mouse Wildtyp (BW)	GGCAGCTGCTTGAACAAGTTC	263bp
NF-IL6 Mutant	CATCAGAGCAGCCGATTGTC	396bp
Einsatz: 13,2 µl Master-Mix + 1,8 µl DNA		

Tabelle 7-5

In der PCR verwendete Primer zur Vermehrung der aus den Ohrstanzproben gewonnenen DNA.

(http://jaxmice.jax.org/protocolsdb/f?p=116:2:2929764060215693::NO:2:P2_MASTER_PROTOCOL_ID,P2_JRS_CODE:1363,006873)

Master Mix		
Substanz	Menge	Firma
Taq-Polymerase	7,5 µl	SIGMA
Primer 1 NF-IL6 Wildtyp (FW)	0,6 µl	EurofinsMWG/Operon
Primer 2 NF-IL6 Wildtyp (BW)	0,6 µl	Eurofins MWG/Operon
NF-IL6 Mutant	0,6 µl	Eurofins MWG/Operon
Autoklaviertes, destilliertes Wasser	4,5 µl	Institutseigene Herstellung

Tabelle 7-6

Zusammensetzung des Master Mixes für die PCR.

Die PCR (Polymerase-Kettenreaktion oder „polymerase-chain-reaction“) ist eine Technik, um mittels des Enzyms DNA-Polymerase eine exponentielle Amplifikation bestimmter Sequenzen eines einzel (ss)- oder doppelsträngigen (ds) DNA-Moleküls *in vitro* durchführen zu können. Die Reaktion lässt sich in drei Schritte unterteilen (Mullis and Faloona, 1987):

1. Denaturierung („Schmelzen“) der ds-DNA-Vorlage
2. Bindung (Annealing) der spezifischen Primer an dem DNA-Stück, welches von Interesse ist
3. Synthese/Elongation des ds-DNA-Amplifikats

Das oben genannte Enzym ist die Taq-Polymerase (Mühlhardt, 2009), die ein wichtiges Kriterium für die Durchführbarkeit der PCR erfüllt, da sie bis 95°C hitzestabil ist und die notwendige Erwärmung des Ansatzes zur Trennung des Doppelstranges unbeschadet übersteht. Sie katalysiert die Initiation der DNA-Vermehrung, für die Oligonukleotidprimer als „Bausteine“ benötigt werden. Als erstes trennen sich bei 94°-95°C die beiden Stränge der DNA-Vorlage, auch „Template“ genannt. Wenn daraufhin die Temperatur wieder auf 64°C gesenkt wird, lagern sich die Primer an die Einzelstränge an. Für den Elongationsschritt wird die Temperatur auf 72°C erhöht, um das Temperaturoptimum der Taq-Polymerase zu erreichen. Diese synthetisiert nun vom Primer ausgehend und aus den im Reaktionsansatz vorliegenden Desoxyribonucleosidtriphosphat-Molekülen (dNTPs) einen komplementären Strang und wenn dieser Reaktionszyklus beendet wurde, liegt eine Kopie des dsDNA-Templates vor. In jedem Reaktionszyklus findet eine Verdopplung der Anzahl der DNA-Kopien statt, da die Elongation an beiden Einzelsträngen des Templates abläuft. Für unsere Zwecke benötigt man für eine effektive Amplifikation der gewünschten Sequenz 35 solcher Reaktionszyklen. In der Theorie müsste sich nach jedem Zyklus die vorherige Template Menge verdoppeln. Durch die Abnahme der intakten dNTPs und der Primer, die Akkumulation von Pyrophosphat und die Bindung der Amplifikate untereinander, fällt allerdings mit Fortschreiten der Reaktion die Vermehrungsrate ab, die dann nach einer bestimmten Anzahl an Zyklen in eine sogenannte Plateauphase übergeht (Abbildung 7-6).

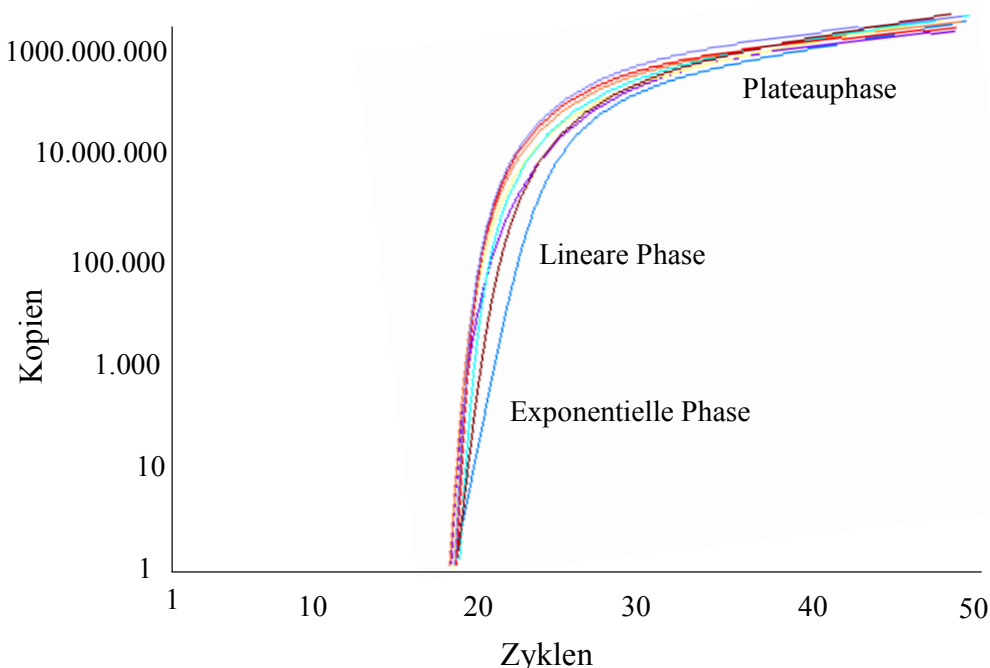


Abbildung 7-6

Die Abbildung zeigt die verschiedenen Phasen der PCR (Exponentielle-, Lineare- und Plateauphase), indem die Anzahl der amplifizierten Gensequenzkopien gegen die durchgelaufenen PCR-Zyklen aufgetragen wurden.

Abbildung modifiziert nach: Applied Biosystems „Real Time PCR vs. Traditional PCR vs. Digital PCR“

7.1.9.2.PCR-Protokoll

PCR Protokoll für 35 Zyklen (Schritte 2-4)		
Schritt	Temperatur	Zeit
1.	94°C	für 3 min.
2.	94°C	für 30 s
3.	64°C	für 30 s
4.	72°C	für 2 min.
5.	4°C	für eine unlimitierte Zeitangabe

Tabelle 7-7

Protokoll der für diese Arbeit verwendeten PCR.

7.1.9.3.Gel-Elektrophorese mit einem Ethidiumbromidgel

Bezeichnung	Zusammensetzung	Hersteller
Stammlösung	1 Liter besteht aus: 54 g Tris Base (Sigma T6066) 27,5 g Borsäure (BO252) 20 ml 0,5M EDTA 930 ml Auqa dd. pH auf 8,1 bis 8,5 einstellen und dann auf 1000 ml auffüllen	Institutseigene Mischung
Gebrauchslösung	Stammlösung 1:10 verdünnt, d.h. 100 ml 5xTBE + 900 ml Auqa dd EDTA 0,5 M Lösung, Molekulargewicht: 372,2 g/Mol, 1 Liter enthält: 186,1 g EDTA in Aqua dd.; pH auf 8,0 einstellen mit NaOH; autoklaviert	Institutseigene Mischung
Ultra Pure™ Agarose	100 mg	Invitrogen
Ethidiumbromid	10 mg/ml	SIGMA
DNA-Leiter	Ready Load™ 100bp	Invitrogen
Gelkammer mit Kämmen	Typ G45/1 Agagel Standard ohne Kühlung	Biometrische Analytik GmbH
Elektrophorese-Gerät	Power Pac 200	Bio Rad, München

Tabelle 7-8

Verwendete Chemikalien, Lösungen und technische Geräte für die durchgeführte Gel-Elektrophorese.

Für die sich an die PCR anschließende Gel-Elektrophorese wurde ein 2%iges Agarosegel hergestellt, in dem 1 g der Agarose mit 50 ml der Gebrauchslösung bei 100°C für 90 s in der Mikrowelle aufgeköcht wurden. Anschließend kühlte die Vorstufe zum Gel unter Rühren ab und bei einer Temperatur von ca. 36°C (handwarm) wurden 2,5 µl Ethidiumbromid hinzugefügt. Das nun sich verfestigende Gel wurde in eine dafür vorgesehene Form gegossen.

Es musste dabei unbedingt auf Staubfreiheit der Form und auf ein möglichst luftblasenfreies Gel geachtet werden. Der Kamm wurde in die dafür vorgesehene Position gesteckt, welcher die Aussparungen für die Taschen formte, in welche anschließend das PCR-Material pipettiert wurde. Nach 20 Minuten war das Gel getrocknet und konnte aus der Gießform gehoben und in die Elektrophoreseeinheit überführt werden. Der Kamm wurde vorsichtig entnommen und die Geltaschen auf ihre Unversehrtheit geprüft. Es wurde eine entsprechende Menge der Gebrauchslösung in die Form gegossen bis das Gel von einer dünnen Schicht der Lösung bedeckt war. Als erstes wurden 3 µl der DNA-Leiter (100 bp pro Bande) in die erste Tasche der linken Seite des Gels pipettiert und rechts davon wurde mit 6 µl des entsprechenden PCR-Probenmaterials fortgefahren. Wenn alle Proben verteilt waren, wurde die Gelelektrophorese-Kammer an den entsprechenden Stromkreis angeschlossen und bei max. 100 Volt und 1000 mA für 45 Minuten „laufengelassen“. Es fand eine elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente im Agarose-Gel und eine Färbung mit dem interkalierenden, fluoreszierenden Farbstoff Ethidiumbromid statt. Durch die parallel aufgetragene DNA-Leiter wurde die Bestimmung der relativen Größe der Fragmente im UV-Licht (254 nm) des Molecular Imagers® möglich gemacht, wodurch eine Identifizierung des jeweiligen Genotyps der Tiere stattfinden konnte (Gyllensten and Erlich, 1988, Saiki et al., 1988, Kemp et al., 1989, Higuchi et al., 1992, Higuchi et al., 1993). Mit einer an den Molecular Imager® angeschlossenen Kamera und einer speziellen Software (ChemiDoc™ XRS Imaging System) konnten Fotos des Gels erstellt und die Ergebnisse somit dokumentiert werden (Abbildung 7-7).

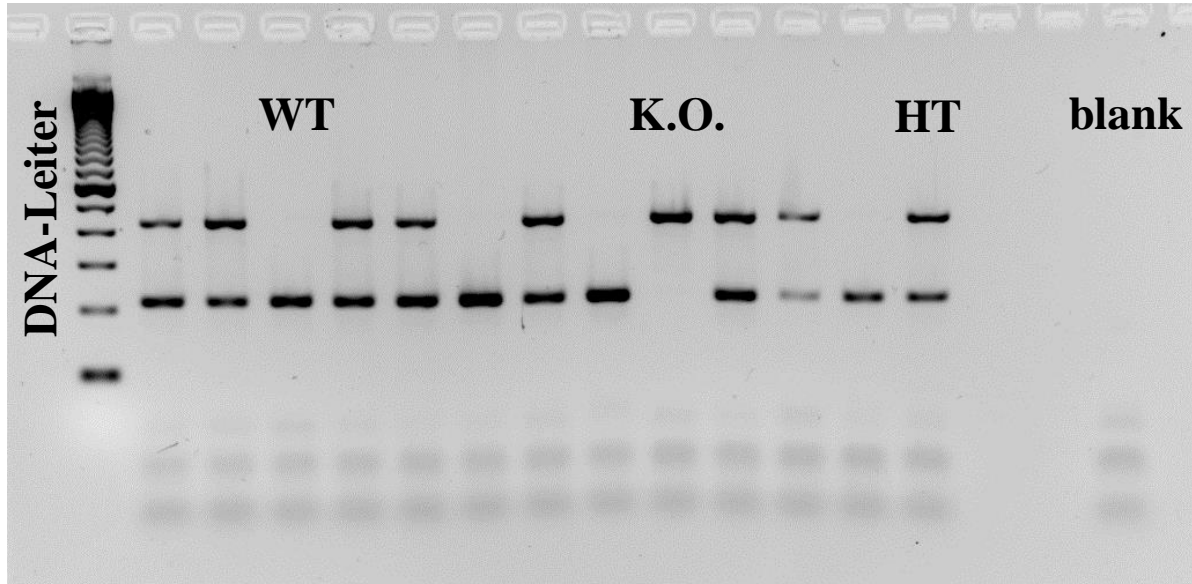


Abbildung 7-7

Typisches Bild einer abgeschlossenen Gel-Elektrophorese mit homozygoten (K.O., 396bp), heterozygoten (HT, 211bp und 396bp) und Wildtyp-Mäusen (WT, 211bp) in den untersuchten Proben 1 bis 13, der DNA-Leiter und einem „blank“ (Reaktionsgemisch ohne cDNA aus der PCR) auf einem 2%igen Agarosegel.

7.2. Telemetrie und Klimakammer

7.2.1. Versuchsbedingungen

Die Open-Field Stress Versuche mit den Ratten wurden in einem Telemetrieräum (separater Raum mit telemetrischem System) durchgeführt. Die Temperatur wurde auf $25 \pm 1^\circ \text{C}$ und die relative Luftfeuchte bei $50 \% \pm 1\%$ eingestellt. Der bisherige hell/dunkel Rhythmus wurde beibehalten (Licht an um 7:00 Uhr). Die Ratten wurden einen Tag vor der geplanten Implantation der Sender in den Versuchsraum verlegt. Nach der Senderimplantation wurden die Ratten täglich zwischen 9:00 und 10:00 Uhr gewogen, wodurch sie sich an die Fixation durch die Hand gewöhnten und gleichzeitig die notwendigen Nachsorgeuntersuchungen an der Bauchnaht durchgeführt und ein Schmerzmittel subcutan (s.c.) (Metacam®, Dosierung: 2 mg/kg KGW) verabreicht werden konnte. Futter und Wasser wurden den Tieren weiterhin zu jeder Zeit *ad libitum* zur Verfügung gestellt.

Die telemetrischen Versuche mit den NF-IL6-Knock-out-Mäusen fanden in einer Klimakammer des Typs 10'US/+5 to +40 DU der Fa. Weiss Umwelttechnik, D-Reiskirchen-Lindenstruth, statt. Diese bot mit den Maßen 2,15 x 2,15 x 2,65 m (Länge x Breite x Höhe) Platz für fünf Versuchstiere. Einstreu und rote Plastikröhren wurden entsprechend der Aufzuchtphase weiter beibehalten. Die Temperatur wurde auf 30°C und die Luftfeuchtigkeit auf $50\% \pm 1\%$ eingestellt und es wurde ein Tag/Nacht-Rhythmus von jeweils 12 Stunden eingerichtet. Auch hier begann der Tagesrhythmus um 7 Uhr morgens. Die Mäuse wurden einen Tag vor der geplanten Implantation der Sender in den Versuchsraum verbracht. In der Rekonvaleszenzphase (sechs bis sieben Tage) nach der Operation wurden sie täglich zwischen 9:00 und 10:00 Uhr gewogen, damit sie sich an das Handling gewöhnten und gleichzeitig die Untersuchung der Bauchnaht sowie die orale Applikation eines Schmerzmittels durchgeführt werden konnte. Durch das tägliche Handling wurde gewährleistet, dass die erforderlichen Zwangsmaßnahmen zur Injektion möglichst stressarm durchgeführt und der stressinduzierte Temperatur- und Aktivitätsanstieg der Mäuse am Tag der Injektion auf ein Minimum reduziert werden konnte. Während der telemetrischen Aufzeichnungen wurden die Mäuse einzeln in speziellen Messkäfigen [30 x 22,5 x 24cm (Länge x Breite x Höhe)] aus transparentem Plexiglas gehalten. Die Käfige besaßen einen abnehmbaren, luftdurchlässigen Deckel und einen verschließbaren Übergang durch die Seitenwand, über welchen das auf einer Waage lokalisierte Futter allzeit und *ad libitum* erreichbar war. Um die Futteraufnahme präzise in Gramm (g) messen zu können, wurden die in der Zucht verwendeten Futter-Pellets für die Dauer des Versuchs zu Pulver zerrieben. Das auch *ad libitum* zur Verfügung gestellte Wasser war für die Mäuse über eine Nippeltränke erreichbar, die über einen Schlauch mit der Wasserflasche auf einer zweiten Waage verbunden war.



Abbildung 7-8

Telemetrisches System der Klimakammer mit den Spezialkäfigen zur Aufzeichnung von Körperkerntemperatur, lokomotorischer Aktivität und Futter- bzw. Wasseraufnahme der Mäuse.

8. Erfassung physiologischer Daten

8.1. Messung von Körpertemperatur und motorischer Aktivität

8.2. Rattensender

Um die Körperkerntemperatur und die lokomotorische Aktivität durchgehend und ohne zusätzlichen Stress für die Tiere messen zu können, wurde den Ratten eine Woche vor Beginn des Open Field Stress Versuches ein Sender (Abbildung 8-1) zur telemetrischen Erfassung intraperitoneal implantiert. Es handelte sich hierbei um einen zylinderförmigen, 23×8 mm großen Transmitter (Volumen $1,33 \text{ cm}^3$, T-4000 E-Mitter® der Firma Respironics Inc-MiniMitter, Bend, OR, USA), dessen Energieversorgung mittels Induktion durch eine Kupferspirale sichergestellt wurde. Die Messung der Temperatur erfolgte über einen wärmeempfindlichen Transistor mit negativem Temperaturkoeffizienten (NTC), welcher seine Radiofrequenzsignale in Herz (Hz) proportional zur Temperaturänderung veränderte. Basierend auf den Referenzfrequenzen für $37,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ und $41,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ stieg die Impulsrate bei Temperaturerhöhung und sank bei deren Erniedrigung. Die Signale wurden von unter den Käfig aufgestellten Empfängerplatten (ER-4000 Receiver, Respironics Inc-MiniMitter, Bend, Or, USA), mit den Maßen $56 \times 29 \times 7$ cm (Länge x Breite x Höhe) registriert und an ein

System zur Datenübertragung (VitalView, Respironics Inc-MiniMitter, Bend. Or, USA) übermittelt, welches die Ergebnisse über einen Computer aufzeichnete. Die Daten zur lokomotorischen Aktivität der Tiere wurden gleichzeitig in diesem System gesammelt, da ein zu diesem Zweck im Sender enthaltenes Trägheitselement Signale erzeugte, die in Abhängigkeit von der relativen Bewegung des Senders zum Empfänger in der Stärke variierten. Von der Platte registrierte Änderungen der Signalstärke korrelierten somit mit der lokomotorischen Aktivität der Tiere und wurden als „activity counts“ in einem festgelegten Zeitintervall von 5 Minuten erfasst (Harkin et al., 2002).

8.3. Mäusesender

Bei den Versuchsmäusen wurde die Operation auch eine Woche vor Versuchsbeginn durchgeführt, allerdings mit einer anderen für Mäuse geeigneten Transmitterart (Firma Mini Mitter Company Inc., Sunriver OR, USA) (Abbildung 8-1). Die Energie der XM-FH Sender wurde in diesem Fall über eine Knopfzelle bezogen und zwei Polyethylenzylinder umschlossen die Messelektronik. Die vorpräparierten Zylinder wurden in eine flüssige Paraffinmischung (Elvax® Coating) getaucht, welches nach Erstarren einen sicheren Schutz vor eindringender Flüssigkeit bot. Die Temperaturmessung erfolgte auch hier über einen Thermistor (wärmeabhängiger Widerstand mit negativem Temperaturkoeffizienten), der einen Oszillatorstromkreis kontrollierte, dessen Frequenz F der vom Thermistor gemessenen Temperatur T entsprach. Das bedeutet, dass eine ansteigende Temperatur zu einer ansteigenden Impulsrate führte und umgekehrt. Dieser Transmitter verfügte auch, wie der bei den Ratten verwendete Sender, über ein eingebautes Trägheitselement zur zusätzlichen Messung der lokomotorischen Aktivität. Deshalb konnten die Bewegungsänderungen des Tieres als Signaländerungen von der Empfängerplatte (RA-1000), welche sich genauso wie für Ratten beschrieben (siehe Kapitel 8.2) unter dem Käfig befand, registriert werden. Die Empfängerplatte entsprach mit ihren Maßen von 30 x 22,5 x 3 cm (Länge x Breite x Höhe) der Grundfläche des Käfigs. An den PC wurden die Signale über einen DP-24 Dataport weitergeleitet, welcher als Analog-Digital-Wandler den aktuellen Temperaturwert in die Spannungsgröße (Volt) übertrug und über einen Verstärker weiterleitete.

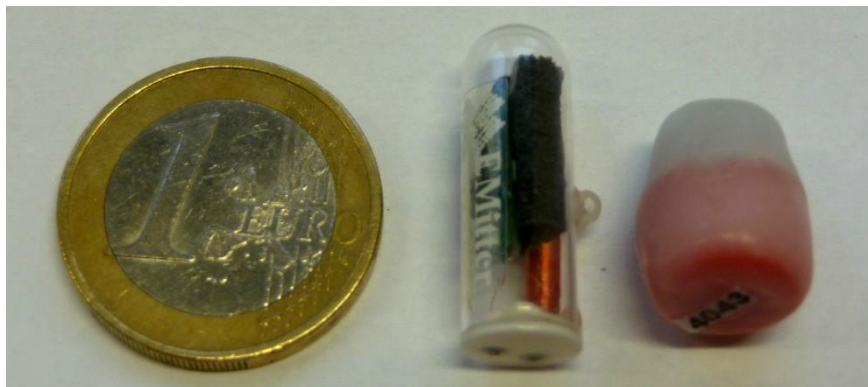


Abbildung 8-1

Radiotransmitter der Ratte (links im Bild) und der Maus (rechts Bild) zur Aufzeichnung der Körperkerntemperatur und der motorischen Aktivität im Vergleich zu einer 1-Euro Münze.

8.3.1. Auswertung und Statistik

8.3.1.1. Körperkerntemperatur

Die mittels des Radiotransmitters und des telemetrischen Systems aufgezeichneten Daten (5 Minuten Zeitintervall) zur Körperkerntemperatur wurden jeweils über einen Zeitraum von 26 Stunden ($t = -2$ h bis 24 h) bzw. für den Open Field Stress Versuch über einen Zeitraum von 6 Stunden ($t = -2$ h bis 4 h) aus dem Messprogramm Vital View® in Excel® überführt und ausgewertet. Zur graphischen Darstellung (Excel®, Prism®) sowie für eine bessere Übersichtlichkeit wurden die Mittelwerte (\pm Standardfehler) von 15 Minuten Intervallen verwendet. Für den statistischen Vergleich der LPS-stimulierten Tiere mit den jeweiligen NaCl-stimulierten Kontrolltieren erfolgte mit Hilfe des Statistikprogramms SigmaStat® eine zweifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) für wiederholte Messungen, der sich ein post-hoc Test nach Bonferroni anschloss (Abbildung 13-3; Abbildung 13-4; Abbildung 15-1; Abbildung 15-2). Der Anstieg der Körperkerntemperatur nach dem Open field Stress Versuch wurde anhand des sog. „Fieberindex“ beurteilt. Diese Größe wurde aus der Integration der Fläche unterhalb der Fieberkurve berechnet und zwar auf der Basis einer anfangs ermittelten, durchschnittlichen Basaltemperatur (Mittelwerte aller Temperaturdaten zwei Stunden vor dem Open Field Stress Versuch). Die berechneten Flächen wurden dann als Mittelwerte (\pm Standardfehler) graphisch dargestellt (Excel®). Für die statistische Bewertung wurde eine einfaktorielle ANOVA mit anschließendem Newman-Keuls post-hoc Test durchgeführt (Prism®) (Abbildung 13-1, A). Für signifikante Unterschiede wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $<5\%$ ($P < 0,05$) festgelegt und diese wurden in den entsprechenden Abbildungen durch unterschiedliche Symbole (z. B. *, **, ***, #, \$, § etc.) angezeigt.

8.3.1.2. Lokomotorische Aktivität

Die lokomotorische Aktivität wurde sowohl auf der Basis kumulativer Werte als auch im zeitlichen Verlauf (Aktivitätsmuster) dargestellt. Die alle 5 Minuten erfassten, sog. „counts“ (siehe Kapitel 8.1) wurden vom Zeitpunkt $t = 0$ (Injektionszeitpunkt, i.p. bzw. Beginn des Open Field Stress Versuchs) bis zum Versuchsende ($t = 24$ h bzw. $t = 4$ h) für jedes Tier erfasst und zusammengezählt. Diese Werte wurden als Mittelwert (\pm Standardfehler) für den Vergleich mit den anderen Versuchsgruppen genutzt. Außer bei den Open Field Stress Versuchen wurde die kumulative Aktivität in der Hell- und Dunkelphase des gesamten Versuchstages (24 h) berechnet (Excel®), da sowohl die Ratten als auch die Mäuse nachtaktiv sind. Die statistische Beurteilung der gewonnenen Daten erfolgte anhand des Programms Prism®. Für die Analyse von zwei Gruppen wurde ein parametrischer t-Test angewendet und für mehrere Gruppen eine einfaktorielle ANOVA mit nachfolgendem Newman-Keuls post-hoc Test durchgeführt. Dadurch, dass auch die verschiedenen Genotypen (Wildtyp- vs. Knock-out-Tiere) untereinander verglichen werden mussten, wurde zusätzlich eine zweifaktorielle ANOVA mit anschließendem Bonferroni post-hoc Test durchgeführt.

Für signifikante Unterschiede wurde erneut eine Irrtumswahrscheinlichkeit $P < 0,05$ festgelegt und auch diese wurden in den entsprechenden Abbildungen durch unterschiedliche Symbole (*, **, ***, #, ##) angezeigt (Abbildung 13-5, C; Abbildung 15-3).

8.4. Erfassung von Futter- und Wasseraufnahme

Die NF-IL6-Knock-out-Mäuse waren in speziellen Messkäfigen untergebracht, welche neben der Messung von Körperkerntemperatur und der lokomotorischen Aktivität auch die tägliche Aufzeichnung von Futter- und Wasseraufnahme ermöglichten. Der Futterbehälter und die Wasserflasche eines jeden Käfigs wurden jeweils auf einer gesonderten Waage platziert. Alle fünf Minuten wurden die Daten der Waagen an einen Dataport übermittelt. Das Computerprogramm "AccuDiet" zeichnete alle 5 Minuten Einzelereignisse sowie kumulative Werte auf. Die Menge an Futter bzw. Wasser, welche die Mäuse innerhalb eines festgelegten Versuchszeitraumes aufnahmen, wurde zunächst für jede Tiergruppe ermittelt (Mittelwerte \pm Standardfehler). Daraufhin wurden die einzelnen Gruppen (die verschiedenen Behandlungen) miteinander verglichen. Da Mäuse nachtaktiv sind, waren deutlichere Unterschiede in der Dunkelphase zu erwarten. Anhand des parametrischen t-Tests (zwei Gruppen) bzw. einer einfaktoriellen ANOVA mit anschließendem post-hoc Test nach Newman-Keuls (mehrere Gruppen) wurden die statistischen Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen ermittelt (Prism®). Dadurch, dass auch hier die Genotypen (Wildtyp- vs. Knock-out-Tiere) untereinander verglichen werden mussten, wurde eine zweifaktorielle ANOVA mit anschließendem Bonferoni post-hoc Test durchgeführt. Auch hier wurde für die signifikanten Unterschiede eine Irrtumswahrscheinlichkeit $P < 0,05$ festgesetzt, die in der Abbildung entsprechend gekennzeichnet wurden (Abbildung 15-6, A).

8.5. Entwicklung der Körpermasse

Ab dem Tag der Operation wurden sowohl die Ratten für den Open Field Stress Versuch als auch die NF-IL6-Knock-out-Mäuse täglich zwischen 9.00 und 10.00 Uhr gewogen, um die Entwicklung der Körpermasse der Tiere zu beobachten und zu dokumentieren.

Der gesamte Verlauf der Körpermassenentwicklung der sich noch im Wachstum befindlichen Versuchstiere wurde somit aufgezeichnet, um bei allen Tieren wichtige Informationen zur Gewichtsentwicklung auch bezüglich der Reaktion auf die applizierten Substanzen sammeln zu können. Für die Bewertung der Entwicklung der Körpermasse der Tiere wurde zunächst der absolute Wert (Mittelwert \pm Standardfehler) der Zu- bzw. Abnahme des Gewichtes in Gramm (g) ermittelt. Für eine verbesserte Darstellung wurden daraufhin die Veränderungen des Ausgangsgewichtes prozentual, bezogen auf das ursprüngliche Gewicht am Morgen des Versuchstages in Excel® berechnet (Mittelwert \pm Standardfehler). Wenn Unterschiede mit $P < 0,05$ auftraten, wurde nach einem parametrischen t-Test (zwei Gruppen) bzw. einer einfaktoriellen ANOVA mit Newman-Keuls post-hoc Test (mehrere Gruppen) angenommen, dass es sich um statistisch signifikante Unterschiede handelte (Prism®) (Abbildung 15-6, B). Um die beiden Genotypen (Wildtyp- vs. Knock-out-Tiere) miteinander zu vergleichen, wurde eine zweifaktorielle ANOVA mit anschließendem Bonferoni post-hoc Test durchgeführt.

8.6. Operationen

8.6.1. Narkose und intraperitoneale Implantation des Radiotransmitters

Am Tag der Operation erfolgte sowohl bei den Ratten (Injektion, 2 mg/kg KGW s.c.) als auch bei den Mäusen (Gabe per os, 0,15 mg/kg KGW) eine Stunde vor Einleitung der Narkose eine Prämedikation mit dem Analgetikum Meloxicam (Metacam®). Die Narkose erfolgte immer als i.p. Injektionsnarkose, wobei beide Medikamente in einer Mischspritze aufgezogen wurden.

Mischung A für die Ratten: 0,25-0,5 mg/kg KGW Medetomidin, 60-75 mg/kg KGW Ketamin i.p.
Mischung B für die Mäuse: 1 ml des 10 %igem Ketamin, 0,25 ml des 2 %igem Xylazin und 5 ml sterile Kochsalzlösung ergaben eine gebrauchsfertige Mischlösung

Da die Mäuse ein Operationsgewicht zwischen 19 und 32 g hatten, erhielten sie zwischen 0,1 und 0,25 ml der vorgemischten Lösung. Um vor Beginn der Implantation des Senders die Tiefe der Narkose und die Schmerzfreiheit zu überprüfen, wurden sowohl bei den Ratten als auch bei den Mäusen der Flexorreflex an der Zwischenzehenhaut der Pfoten sowie der Korneareflex kontrolliert. Es war außerdem sehr wichtig, dass bei den Ratten die Narkosewirkung des Medetomidins frühestens 40 Minuten nach Narkoseinjektion mit Atipamezol [1 mg/kg KGW intramuskulär (i.m.)] teilantagonisiert wurde, damit eine zu frühe Antagonisierung nicht zu einem sog. Ketaminüberhang und somit zu einem verlängertem Nachschlaf führte. Insgesamt konnte durch die Teilantagonisierung der Narkose die Aufwachphase um ca. 15 Minuten verkürzt werden. Die Operation wurde sieben bis zehn Tage vor Versuchsbeginn durchgeführt, um den Tieren ausreichend Gelegenheit zur Erholung zu bieten. Die Ratten und Mäuse wurden auf gleiche Art und Weise operiert: zunächst wurden die Tiere in Rückenlage auf eine Wärmematte gelegt. Um ein Austrocknen der Hornhaut der Augen der Tiere zu verhindern, wurde in beide Lidspalten Vidisic®-Augengel aufgetragen. Die Tiere wurden im Nabelbereich beginnend auf einer Größe von 3 cm cranial und 3 cm caudal des Nabels mit einer Breite von ca. 4 cm geschoren (bei den Mäusen entsprechend kleiner). Danach wurde dreimal (Einwirkzeit von einer Minute) mit Cutasept®-Lösung desinfiziert. Zur Laparatomie wurde vom Nabel ausgehend die Haut ca. 1 cm nach caudal eingeschnitten. Folgend wurde mit einer stumpfen Schere die Unterhaut von der Bauchmuskulatur gelöst, um dann die Bauchhöhle durch eine Stichinzision entlang der *Linea alba* zu eröffnen. Hierzu wurde die Muskulatur mit einer chirurgischen Pinzette erfasst, vorsichtig nach oben gezogen und mit einer Skalpellklinge eine Inzision in der *Linea alba* vorgenommen (Abbildung 8-2). Die Wundränder wurden unter dem Schutz einer eingeführten Pinzette mit einer Schere nach Metzenbaum für die zu implantierenden Sender vergrößert. Die Sender wurden zunächst in 70 %igem Alkohol desinfiziert und mit steriler Kochsalzlösung abgewaschen bevor sie in die eröffnete Bauchhöhle des Tieres eingelegt werden konnten (Abbildung 8-3). Die Wunde wurde in zwei Schichten vernäht. Die Muskulatur bei den Ratten fortlaufend und bei den Mäusen mit Einzelheften und

resorbierbaren Nahtmaterial. Die Haut wurde aus Sicherheitsgründen mit nicht-resorbierbarem Nahtmaterial in Einzelheften vernäht (Abbildung 8-4), mit einer Jodlösung gesäubert und abschließend mit einem Aluminium Spray abgedeckt.



Abbildung 8-2

Vollständige Eröffnung der Bauchhöhle mit Sicht auf das Darmkonvolut.



Abbildung 8-3

Einsetzen des Senders in die Bauchhöhle.



Abbildung 8-4

Peritoneum und Haut sind wieder vollständig vernäht.

8.6.2. Nachsorge

In der sich anschließenden Aufwachphase wurden die Tiere regelmäßige kontrolliert. Durch die Anwendung von Wärmematten als Käfigunterlage und einer Wärmelampe konnte ein starkes Absinken der Körperkerntemperatur verhindert werden.

24 h sowie 48 h *post operationem* wurde den Ratten s.c. und den Mäusen erneut per os Meloxicam verabreicht. Täglich zwischen 9.00 und 10.00 Uhr wurden die Tiere gewogen, die Futter- und Wasseraufnahme, das Allgemeinbefinden sowie der Zustand der Operationsnaht kontrolliert und dokumentiert.

8.7. Stimulation der Versuchstiere und Injektionen

8.7.1. Intraperitoneale Injektion von LPS bei NF-IL6-Knock-out-Mäusen

Alle i.p. Injektionen fanden zwischen 9.00 und 10.00 Uhr in der Hellphase des Beleuchtungszyklus statt. Das zu verwendende LPS, welches in zwei verschiedenen Dosen (50 µg/kg KGW und 2,5 mg/kg KGW) injiziert wurde, musste eine Stunde vor dem geplanten Versuch aufgetaut und auf Körpertemperatur erwärmt werden. Das LPS wurde mittels sterilen Einwegspritzen und einem Volumen von 5 ml/kg appliziert (LPS mit Kochsalzlösung 1:5 verdünnt). Es erfolgte die vorsichtige Injektion auf der rechten Seite der Medianen in der *Regio umbilicalis* der Mäuse. Die Kontrolltiere bekamen das gleiche Volumen an NaCl verabreicht (Abbildung 8-5).



Tag 1: alle Mäuse nehmen am Open Field Stress Versuch teil	
1. Gruppe  Tag 3: NaCl-Injektion Tag 8: 2,5 mg/kg LPS-Injektion	2. Gruppe  Tag 3: 50 µg/kg LPS-Injektion Tag 8: NaCl-Injektion

Abbildung 8-5

Die 1. Versuchsgruppe bekam bei der 1. Injektion NaCl gespritzt und 5 Tage später 2,5 mg/kg KGW LPS. Die 2. Versuchsgruppe bekam bei der 1. Injektion 50 µg/kg KGW LPS i.p. gespritzt und 5 Tage später NaCl. Beide Gruppen nahmen zwei Tage vor Beginn der jeweils ersten Injektion zum Zeitpunkt des Käfigwechsels an einem Open Field Stress Versuch teil [Aufzeichnung der Reaktion (Körperkerntemperatur, lokomotorische Aktivität) über 4 Stunden nach dem notwendigen Käfigwechsel für die Telemetrie bei Mäusen und Ratten].

LPS: Lipopolysaccharid, NaCl: sterile Kochsalzlösung

8.7.2. Erzeugung des Open Field Stress

Der Open Field Stress wurde um 10.00 Uhr in der Hellphase des Beleuchtungszyklus im Telemetrieräum induziert. Die für den Open Field Stress Versuch vorgesehenen Ratten wurden am Versuchstag selbst nicht wie ansonsten zur täglichen Kontrolle um 9.00 Uhr gewogen und in der Hand gehalten, um einen den Versuch beeinflussenden vorausgehenden

Temperaturanstieg zu vermeiden. Die verwendeten Ratten wurden alle gleichzeitig per Hand in die Versuchskäfige überführt, jeweils zu unterschiedlichen Zeitpunkten (nach 30, 60, 90, 120 oder 240 Minuten) entnommen und in eine tiefe Narkose gelegt. Alle Tiere wurden nach Erreichen einer ausreichenden Narkosetiefe durch eine transkardiale Perfusion getötet und entsprechendes Material für spätere biochemische Untersuchung entnommen. Der Versuchskäfig war ein Polycarbonatkäfig Typ IV (38 x 59 x 18 cm/Breite x Tiefe x Höhe) und enthielt keinerlei Einstreu, Futter oder Wasser. Die neue Umgebung in einem völlig leeren Käfig führte zu einem typischen Erkundungsverhalten und einem deutlichen, stressbedingten Temperaturanstieg (LeMay et al., 1990, Oka et al., 2001, Adriaan Bouwknecht et al., 2007).

Die Kontrolltiere verblieben hingegen in ihrem ursprünglichen Käfig (Polycarbonatkäfig Typ III) mit Einstreu, Futter und Wasser *ad libitum*. Nach Ablauf der Versuchszeit (an zwei Zeitpunkten: 60 und 240 Minuten) wurden auch die Kontrolltiere in eine tiefe Narkose gelegt und transkardial perfundiert. Die Körperkerntemperatur und die motorische Aktivität der Tiere wurde telemetrisch alle 5 Minuten aufgezeichnet (siehe Kapitel 8.2). Die Mäuse wurden lediglich in die Versuchskäfige der Telemetrie umgesetzt. Dann wurde die entsprechende Reaktion auf die neue Umgebung ähnlich wie bei den Ratten aufgezeichnet. Eine Perfusion nach der Aufzeichnung der Körperkerntemperatur und der lokomotorischen Aktivität wurde bei den NF-IL6-Knock-out-Mäusen nicht durchgeführt.

8.8. Perfusion und Organentnahme

8.8.1. Biologisches Material

8.8.1.1. Blut/Plasma

Die Blutproben für die IL-6- und TNF- α -Bestimmungen wurden von tief narkotisierten Tieren vor der Perfusion transkardial aus der linken Kammer des noch schlagenden Herzens entnommen (Ratten: ca. 5 ml, NF-IL6-Knock-out-Mäuse: ca. 0,6-1 ml). Dafür wurde eine 5 ml bzw. 1 ml Spritze mit Heparin (Heparin-Natrium-5.000 rathiofarm®) ausgespült und mit einer 23-G Kanüle versehen, um ein Gerinnen der Blutprobe zu verhindern. Die Blutprobe wurden in einer Mikrozentrifuge bei 10.000 rpm 5 Minuten lang zentrifugiert und das abpipettierte Plasma in mehrere 2 ml Eppendorf Tubes aliquotiert und zu weiteren Untersuchung bei -40°C aufbewahrt.

8.8.1.2. Kapselflüssigkeit der NF-IL6-Knock-out-Mäuse

Nach Eröffnung der Bauchhöhle im Zuge der Perfusion fiel auf, dass sich um die Sender der NF-IL6-Knock-out-Mäuse eine flüssigkeitsgefüllte Kapsel gebildet hatte. Um diese sich um den implantierten Sender angefüllte Flüssigkeit weiter untersuchen zu können, wurden ca. 0,5-1 ml Exsudat aus der Kapsel entnommen (23-G Kanüle versehene 1 ml Spritze) und in EDTA-gefüllte 2 ml Sammel tubes gefüllt. Die Flüssigkeit wurde in einer Mikrozentrifuge bei 10.000 rpm 5 Minuten lang zentrifugiert und der Überstand in 2 ml Eppendorf Tubes abgefüllt und bei -40°C gelagert. Die zurückbleibende Zellsuspension wurde auf

Objektträgern ausgestrichen und bis zur weiteren Untersuchung getrocknet (Untersuchungen sind Teil eines anderen Dissertationsprojektes).

8.8.2. Perfusion, RNA-Extraktion und RT-PCR

Die Perfusionsanlage setzte sich aus einem Pumpensystem mit Schläuchen zusammen und war mit einer Flasche Kochsalzlösung verbunden. Durch einen Dreiwegehahn wurde der Fluss der Lösung in das Schlauchsystem kontrolliert. Des Weiteren wurden ein Metallgitter zur Fixation der Tiere und eine Wanne zum Auffangen der austretenden Perfusionsflüssigkeit aufgestellt. Die Ratten wurden 30, 60, 90, 120 oder 240 Minuten nach Open Field Stress und die NF-IL6-Knock-out-Mäuse 24h nach Injektion von LPS oder NaCl durch die i.p. Injektion einer Überdosis (43 mg/100 g KGW) an Pentobarbital (Narcoren®) in eine sehr tiefe Narkose versetzt, und in Rückenlage auf dem Metallgitter der Perfusionswanne mit Klebeband (Silkafix®) fixiert. Die Bauchhöhle wurde caudal des Sternums eröffnet, um dann den durchgeführten Schnitt entlang der beiden Rippenbögen bis zum Diaphragma zu verlängern. Nachdem ventral auf beiden Seiten die letzten Rippen durchtrennt waren, wurde das Diaphragma abgelöst. Um eine gute Aufsicht auf das Herz und die dazugehörigen Gefäße zu bekommen, wurde mittels Nadelhalters das Sternum cranial des gesamten Tieres aufgebogen und fixiert. Der Herzbeutel wurde stumpf eröffnet, um dann aus dem rechten Ventrikel mit einer heparinisierten Spritze mit aufgesetzter Kanüle langsam Blut für die Zytokinmessung zu entnehmen. Daraufhin erfolgte mit einer kleinen, spitzen Operationsschere die Präparation eines Lochs in den mittleren Bereich des linken Ventrikels, in welches die stumpfe Perfusionskanüle mit dem angeschlossenen Schlauch bis in den Ursprung der Aorta vorgeschoben wurde (bei den Mäusen lediglich ein Einstich in den linken Herzventrikel). Das Einströmen der Perfusionslösung wurde gestartet und zeitgleich mit einem weiteren Schnitt der rechte Vorhof des Herzens eröffnet. Das System pumpte mit einem Druck von ca. 120 mmHg bei einer Ratte ein Volumen von 200-300 ml und bei einer Maus (tropfenweise, Stufe 7-8 der Perfusionspumpe) ein Volumen von 5-10 ml eiskalte 0,9%ige Kochsalzlösung in den Blutkreislauf des Tieres, so dass das Tier vollständig entblutet wurde. Dies zeigte sich zum einen durch die zunehmende Blässe der Leber und zum anderen durch das Klarwerden der aus dem Herz austretenden Flüssigkeit.

8.8.3. Organentnahme

8.8.3.1. Gehirn und Hypophyse

Dem perfundierten Tier wurde auf Höhe des dritten Halswirbels der Kopf abgetrennt. Daraufhin wurde mit einer Skalpellklinge ein Schnitt vom *Os nasale* bis zum caudalen Ende des Schädels gemacht und die Haut nach craniolateral vom Schädel abgezogen, wobei Anteile des *Musculus masseter*, Bindegewebe und die Wirbelkörper der ersten drei Halswirbel entfernt wurden. Um die Schädeldecke mit einer Knochenzange entfernen zu können, wurden von caudal beginnend im Bereich der *Condyl*i vorsichtig die Schädelplatten bis zum Bregma abgelöst. Das so freigelegte Gehirn wurde von den Hirnhäuten und den ventral austretenden Gehirnnerven befreit. Daraufhin wurde mit einem Metallspatel das Riechhirn durchtrennt und

dadurch das gesamte Gehirn aus dem *Cavum cranii* entfernt. Die Hypophyse wurde durch das Entnehmen des Gehirns abgetrennt und verblieb im *Sella turcica* im Schädel des Tieres bis sie mittels Metallspatel entnommen und unverzüglich in einer Plastikschiene in Tissue Freezing Medium® eingebettet und in Trockeneis schockgefroren wurde. Danach wurde das restliche Gehirn mit einer Skalpellklinge an der *Fissura transversa cerebelli* in das Kleinhirn mit darunterliegendem Stammhirn und in das Großhirn geteilt, welche auch in Trockeneis schockgefroren wurden. Es war darauf zu achten, dass der Bereich des Hypothalamus mit Tissue Freezing Medium® abgedeckt wurde, um das spätere Anfertigen von Gehirnschnitten im Kryostat zu erleichtern.

8.8.3.2. Leber, Milz, Fettgewebe

Die Bauchhöhle der Tiere war bereits eröffnet, so dass mittels chirurgischer Pinzette und einer kleinen, spitzen Schere die Milz von ihrem Gekröse getrennt und entfernt werden konnte. Daraufhin wurde der linke Leberlappen abgetrennt und subcutanes Fettgewebe seitlich der Bauchwand entnommen. Alle entfernten Gewebe und Organe wurden sofort auf Trockeneis schockgefroren und zeitnah verpackt.

8.8.4. Aufbewahrung der Proben

Um die einzelnen Gehirnteile, Leber, Milz und Fettgewebe vor Austrocknung zu schützen, wurden diese zuerst luftdicht mit einer Schicht Parafilm® und daraufhin zusätzlich in eine Lage Alufolie eingewickelt. Die Aufbewahrung erfolgte in Kunststoffbeuteln mit genauer Beschriftung unter möglichst wenig Lufteinschluss bei -54°C.

8.8.5. Die Herstellung von Gehirnschnitten am Kryostat

Das Schneiden der Gehirne und der Hypophysen der perfundierten Ratten erfolgte in einem Kryostat Typ HM 500 O (Microm/Thermo Scientific) bei -20 bis -28°C Kammertemperatur und einer Objekttemperatur von -8 bis -13°C. Das Großhirn bzw. die Hypophysen wurden in ein Einbettmedium (Tissue Freezing Medium®) eingebettet und dann auf den Objekthalter aufgefroren. Bei den Großhirnen war darauf zu achten, dass der caudale Anteil auf den Objekthalter und die ventrale Seite von der Klinge des Kryostats weg ausgerichtet wurde und generell von rostral beginnend geschnitten wurde. Sobald das Gewebe fest eingebettet und korrekt ausgerichtet war, wurden mittels einer handbetriebenen Klinge 20 µm dicke, coronale Schnitte angefertigt. Durch den ständigen Abgleich mit einem Atlas für coronale Gehirnschnitte des Rattengehirns (Paxinos and Watson, 1998), konnte das Gehirn auf eine exakte coronale Schnittebene ausgerichtet werden. Die Schnitte entfalteten sich bei einer optimalen Temperatur auf der Klinge unter dem Schnittstrecker und konnten dann auf vorgekühlte Objektträger aufgebracht und sofort durch leichtes Erwärmen der Rückseite mit dem Finger oder Handrücken am Objektträger fixiert werden. Es wurden ausschließlich mit Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger verwendet, da diese Substanz zu einer optimalen Anhaftung der Schnitte am Objektträger führt (Mazia et al., 1975).

Der für unsere Untersuchungen wichtige Bereich umfasste folgende Gehirngebiete:

OVLT (<i>Organum vasculosum laminae terminalis</i>)
SFO (<i>Organum subfornicale</i>)
PVN (<i>Nucleus paraventricularis</i>)
SON (<i>Nucleus supraopticus</i>)
ME (<i>Eminentia mediana</i>)

Von jedem dieser Gebiete wurden mindestens fünfzehn 20 µm dicke Schnitte angefertigt und die dazwischen liegenden Bereiche für PCR-Analysen als 40-80 µm dicke Schnitte übereinander liegend auf einem anderen Objektträger gesammelt. Mit einer vorgekühlten Skalpellschneideklinge wurden der Hypothalamus und die jeweils dorsal und lateral gelegenen Gebiete ausgeschnitten, in der Mitte in zwei Hälften getrennt und jeweils in Eppendorf Gefäße überführt. Alle Objektträger und Gehirnproben wurden bis zur weiteren Untersuchung bei -54°C gelagert.

9. Erfassung biochemischer Parameter

9.1. Immunhistochemie und Immunzytochemie

9.1.1. Grundlagen der Immunhistochemie und Immunzytochemie

Mit der Methode der Immunhistochemie und auch der Immunzytochemie konnten spezifische Antigene in den histologischen Gewebeschnitten der Gehirne oder in Zellen der primären HVL-Zellkultur nachgewiesen werden. Dieser Nachweis basierte auf einer spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktion (Schlüssel-Schloss-Prinzip). Die Paratope der Antikörper reagierten mit den Epitopen der zu detektierenden Antigene, wodurch es zur reversiblen Bindung kam. Die Antigen-Antikörper-Komplexe wurden durch indirekte Immunfluoreszenz sichtbar und somit lokalisierbar gemacht (Coons and Kaplan, 1950). Eine Verstärkung des Fluoreszenzsignals konnte dadurch erreicht werden, dass pro IgG-Molekül des Primärantikörpers mehrere IgG-Moleküle des Sekundärantikörpers gebunden wurden. Der sekundäre Antikörper war mit einem Fluorochrom gekoppelt und diente der Detektion der primären Antigen-Antikörper-Komplexe, indem dieser sich gegen das Wirtstier (Kaninchen, Maus, Schaf, Ziege)-spezifische Fc-Fragment (= "fragment crystalline") richtete. Mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops konnte das Fluorochrom mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt werden, was zum Abstrahlen von Fluoreszenzlicht führte, welches langwelliger als das anregende Licht war (Abbildung 9-1). Dieses Licht konnte durch spezielle Sperrfilter betrachtet werden, was die Antigen-Antikörper-Komplexe für den Untersuchenden sichtbar machte.

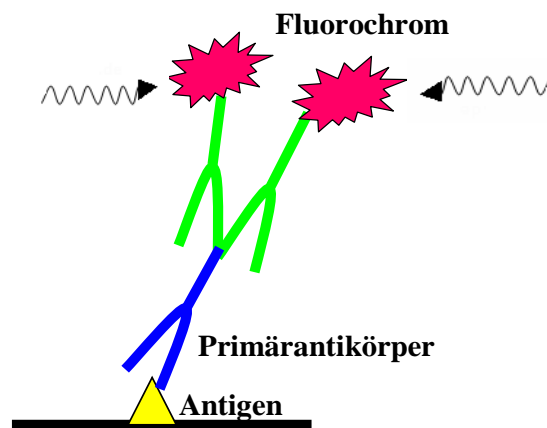


Abbildung 9-1

Das Epitop des Antigens im Gewebe wird vom primären Antikörper spezifisch erkannt (Schlüssel-Schloss-Prinzip) und gebunden. Daraufhin binden die Fluorochrom-markierten Sekundärantikörper das Wirtstier-spezifische Fc-Fragment des Primärantikörpers. Licht mit der Exzitationswellenlänge (grün) regt die Fluorochrome an und wenige Nanosekunden später strahlen diese ein Licht einer spezifischen, anderen Wellenlänge (rot, z.B. Cy3TM) ab. Mit einem Fluoreszenzmikroskop kann das abgestrahlte Licht beobachtet werden.

Abbildung modifiziert nach (Luttmann, 2006, Damm, 2012).

9.1.1.1. Antikörper

9.1.1.2. Primäre Antikörper

Für den Nachweis des nukleären NF-IL-6- und STAT3-Signals in der Zelle und der gleichzeitigen Kennzeichnung von spezifischen Zellphänotypen (Endothelzellen, Astrozyten, aktivierte Mikrogliazellen, perivaskuläre Makrophagen, corticotrope Zellen, Neurone mit NO-Synthase), wurden Antikörper aus verschiedenen Tierarten verwendet. Es wurden immer zwei Primärantikörper in einer Inkubationslösung angesetzt. Es musste darauf geachtet werden, dass diese Primärantikörper aus zwei verschiedenen Tierarten stammten, um unspezifische Kreuzreaktionen der Sekundärantikörper möglichst ausschließen zu können. Ein gegen das Protein „von Willebrand Faktor“ (vW) gerichteter Antikörper wurde als Markerprotein zur Kennzeichnung von Endothelzellen benutzt (Konsman et al., 2004, Rummel et al., 2005, Rummel et al., 2008). Das gleiche Prinzip wurde gegen das zytoplasmatische Intermediärfilament „glial fibrillary acidic protein“ (GFAP) angewendet, um Astrozyten bzw. astrozytenartige Zellen (z. B. Pituizyten) darzustellen (Debus et al., 1983). An den Membranen von aktivierten Mikrogliazellen und perivaskulären Makrophagen befinden sich die Oberflächenproteine CD68 und CD163. Diese Proteine wurden durch die Antikörper ED1 (Bauer et al., 1994, Damoiseaux et al., 1994) und ED2 (Graeber et al., 1989, Barbe et al., 1990) markiert. Corticotrope Zellen der Hypophyse konnten durch einen Antikörper der gegen das Hormon ACTH gerichtet ist, sichtbar gemacht werden (Blähser, 1988). Neurone, die das Enzym neuronale NO-Synthase besitzen und somit in der Lage sind Stickstoffmonoxid zu synthetisieren, wurden über einen Antikörper markiert, welcher genau dieses Enzym detektieren kann (Hashida-Okumura et al., 1999, Alm et al., 2000, Atamna et al., 2002).

9.1.1.3. Sekundäre Antikörper

Es wurden bei der Verwendung von zwei primären Antikörpern auch jeweils zwei passende, gegen die Spezies des jeweiligen Primärantikörpers gerichtete, Sekundärantikörper in einer zweiten Inkubationslösung angesetzt (Konzentration 1:500). Diese Sekundärantikörper waren mit verschiedenen Fluorochromen markiert, um die unterschiedlichen, primären Antigen-Antikörper-Komplexe detektieren zu können.

9.1.1.4. Fluoreszenz-Kernfarbstoff (DAPI)

DAPI (4',6-Diamidino-2'-Phenylindol Dilaktat, Anregungswelle 359 nm) ist ein unspezifischer Zellkernmarker und markiert unabhängig vom Zelltyp alle Zellkerne im Gehirnschnitt. DAPI war in Aliquots bei -20°C tiefgefroren und wurde vor dem Inkubationsbeginn in 0,1 M PBS gelöst und in einer Konzentration von 1:10.000 eingesetzt (DAPI-Lösung). Die Inkubation erfolgte lichtgeschützt bei Raumtemperatur (RT) für 10 Minuten.

9.1.2. Versuchsprotokoll Immunhistochemie

	Arbeitsschritt	Reagenz	Temp.	Zeit
1	Schnitte aufwärmen	im Kryostat	-20°C	10 min
2	Trocknen	Schnitte werden mit dem Pap-Pen (Fettstift) umrundet	RT	ca. 5 min
3	Fixation	mit 2%igem PFA	RT	10 min
4	Waschen	PBS	RT	3x5 min
5	Blocken	Block-Lösung, in feuchter Kammer	RT	1 h
6	1. Inkubation	Primärantikörper, Ansatz in Block-Lösung, ca. 300 µl pro Objektträger	4°C	24 h.
7	Waschen	PBS	RT	3x5 min.
8	2. Inkubation	Sekundärantikörper, Ansatz in Block-Lösung, ca. 300 µl pro Objektträger DUNKEL	RT	2 h
9	Waschen	PBS DUNKEL	RT	3x5 min.
10	3. Inkubation	DAPI-Lösung, vorinkubiert, DUNKEL	RT	10 min
11	Waschen	PBS	RT	3x5 min.

		DUNKEL		
12	Deckeln	2 Tropfen Citifluor®, abdecken mit Deckgläschen, Lagerung bei 4°C		

Tabelle 9-1**Ablauf der einzelnen Schritte der Immunhistochemie mit Zeit- und Temperaturangaben****(RT= Raumtemperatur; PBS= Phosphatgepufferte Salzlösung; PFA= Paraformaldehyd).**

Das zuvor geschnittene, sich auf den Objektträgern befindliche Gewebe wurde nach der Lagerung bei -54°C etwas erwärmt (Kryostat -20°C) und anschließend bei RT getrocknet. Nach der Umrandung mit dem Pap-Pen (Fettstift) erfolgte die Fixierung der Gewebeschnitte mit 2%igem Paraformaldehyd (PFA), damit die zu detektierenden Antigene während des Färbeprozesses vor Veränderungen geschützt waren. Die sog. Blocking-Lösung (Inkubationspuffer mit 10% NDS) sorgte dafür, dass die unspezifischen Bindungsstellen des Gewebes besetzt waren und eine unspezifische Bindung der Antikörper vermieden wurde. Zusätzlich wurde das Detergens Triton X 100 in der Inkubationslösung verwendet, um die Zellmembranen für die verwendeten Antikörper durchlässig zu machen. Die Konzentration musste jeweils an das Optimum des verwendeten Antikörpers angepasst werden (kein Triton X bzw. 0,1 bis 0,3%). Die Primärantikörper mussten über Nacht (24 h) und bei Kühlschranktemperatur (4-7°C) und die Sekundärantikörper für 2 h bei Raumtemperatur inkubieren. Alle Arbeitsschritte, die nach dem Auftragen der Sekundärantikörper bis zur Mikroskopie durchgeführt wurden, mussten unter lichtgeschützten Bedingungen stattfinden, um ein Ausbleichen der Gewebeschnitte durch Anregung bzw. Zerfall der Fluorochrome zu verhindern. Das Färben der Gewebeschnitte mit der DAPI-Kernfärbung diente dem unspezifischen Markieren der Zellkerne (Kapitel 9.1.1.4). Nach dem Auftragen von 2-4 Tropfen Citifluor®, erfolgte das Auflegen des Deckgläschens. Die fertigen Gewebeschnitte wurden in lichtundurchlässigen Mappen bei 4°C in einer Kühlkammer gelagert (max. 14 Tage).

9.1.3. Versuchsprotokoll Immunzytochemie

Arbeitsschritt	Vorgehensweise	Zeit und Temperatur
dreimaliges waschen der zuvor mit 4%igem PFA fixierten Zellen	PBS-T	3x5 min., RT
Blocking	Blocking-Lösung (10% FKS; 0,05% Triton X),	60 min., RT
Inkubation I	Primärantikörper, feuchte Kammer	48 h, 4°C
dreimaliges waschen	PBS-T	3x5 min., RT
Inkubation II	Sekundärantikörper, feuchte Kammer, DUNKEL	120 min., RT
Inkubation III	DAPI-Lösung DUNKEL	10 min., RT
deckeln	Deckgläschen in Aqua dd. tauchen, Unterseite trocknen, Citifluor auf Objektträger, Deckgläschen auf Objektträger legen (mit der bewachsenen Seite nach unten)	

Tabelle 9-2

Ablauf der einzelnen Schritte der Immunzytochemie mit Zeit- und Temperaturangaben

(RT= Raumtemperatur; PBS-T= Phosphatgepufferte Salzlösung mit Triton X; PFA= Paraformaldehyd; DAPI= Fluoreszenz-Kernfarbstoff).

9.1.4. Fluoreszenzmikroskopie und Auswertung

Für die Auswertung der histologischen und zytologischen Immunfluoreszenzmarkierungen in den Gehirnschnitten und den primären Zellkulturen des Hypophysenvorderlappens wurde ein Fluoreszenzmikroskop (BX50) mit den Objektiven 10-, 20-, 40-, und 100-facher Vergrößerung verwendet. Das Licht einer Quecksilberdampf Lampe (BH2-RFL-T3) wurde über Filter auf die zu untersuchenden Gehirnschnitte oder Zellen einer Kultur gerichtet und regte somit die Fluorophore in den Präparaten an. An das Mikroskop war eine Visicam-12-Bit-Kamera (schwarzweiß) angeschlossen, mit welcher Bilder der Präparate erstellt werden konnten. Um während der Aufnahmen verschiedene Parameter steuern zu können, wurde ein an die Kamera angeschlossener Computer mit der Software Metamorph (Version 5.05) benutzt. Mit diesem konnten auch farbige Mehrkanal-RGB-Bilder aus den Schwarzweiß-Bildern erstellen werden. Die verwendeten Alexa488-gekoppelten Immunglobuline wurden mit einem Fluoreszenzfiltermodul für Breitband-FITC (U-MWIBA) bei einer Wellenlänge von 460-490 nm und die Cy3-gekoppelten Immunglobuline (Filtermodul U-MNIG) bei einer Wellenlänge von 520-550 nm angeregt. Um die einzelnen, mit DAPI gefärbten Zellkerne anregen zu können, wurde ein Filtermodul zur Breitband-UV-Anregung (U-MWU) mit einer Wellenlänge von 330-385 nm eingesetzt. Die erstellten Bilder wurden mit einem

Bildbearbeitungsprogramm (Adobe Photoshop 5.05) bearbeitet, um Kontrast, Helligkeit und Farbbalance anzupassen und die Einzelfotos zu einer Bildtafel zusammenzustellen. Zusätzlich wurde für manche Studien für verschiedene Tiergruppen/Versuchsgruppen und Gehirnregionen eine Tabelle zur qualitativen Beurteilung der Stärke und Anzahl der nukleären Verteilung der NF-IL6-Signale erstellt. Dazu wurde ein fünf Stufen Bewertungssystem angewendet:

+++ = hohe Dichte nukleärer Signale (5)
++ = mittlere bis moderate Dichte (4)
+ = niedrige Dichte (3)
± = einzelne nukleäre Signale (2)
- = keine nukleären Signale (1)

Tabelle 9-3

Eine Bewertung der relativen Dichte an nukleären NF-IL6-Signalen in der jeweiligen Gehirnregion wurde anhand eines Fünfpunkteschemas vollzogen: (5 Punkte) +++ = hohe Dichte, (4 Punkte) ++ = mittlere bis moderate Dichte, (3 Punkte) + = niedrige Dichte, (2) ± = einzelne Signale in einigen Fällen, (1) - = keine Signale.

Es erfolgte für jede Tiergruppe/Versuchsgruppe die Addierung der vergebenen Punkte und dieses Endergebnis wurde durch die Anzahl der Tiere bzw. der Gruppen (n) geteilt, so dass man für jede Gruppe einen Mittelwert erhielt, der für die Beurteilung genutzt wurde.

9.2. Zytokinbioassay für die Zytokine IL-6 und TNF- α

9.2.1. Probengewinnung

Die Überstände der primären Zellkultur des HVL wurden vor der Fixierung der Zellen mit 4%igem PFA in 2 ml Eppendorf Tubes gesammelt und bei -20°C tiefgefroren. Die bei den *in vivo* Versuchen der Ratten entnommenen Blutproben wurden vorsichtig geschwenkt, in 2 ml Eppendorf Tubes überführt und auf Eis gelegt. Nach Beendigung der Perfusion wurden die Blutproben mit einer Mikrozentrifuge zentrifugiert (7000 rpm, 10 Minuten) und der Überstand abpipettiert. Dieser wurde bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

9.2.2. Grundlagen der Bioassays

Zur Analyse von Zytokinen in Blutplasmaproben und Überständen wurden zytokinspezifische Bioassays verwendet. Zur Quantifizierung der biologisch aktiven Form verschiedener Zytokin-Proteine in biologischen Flüssigkeiten oder Geweben, wurde ein im Institut für Veterinär-Physiologie und -Biochemie langjährig und erfolgreich etabliertes Zellkultur-Verfahren angewendet (Harré et al., 2003, Hubschle et al., 2006, Roth et al., 2006, Wuchert et al., 2008, Wuchert et al., 2009). Die Grundlage für diese Methode beruhte darauf, dass Zytokine bei bestimmten Zellen verschiedene biologische Reaktionen hervorrufen können. Die Sensitivität des Tests ist sehr hoch, so dass schon minimale Konzentrationen eines Zytokins bei unterschiedlichen Tierspezies genau bestimmt werden können.

Für die vorliegende Arbeit waren die Zytokine TNF- α und IL-6 interessant. Um die Konzentration des Zytokins TNF- α zu bestimmen, nutzte man dessen zytotoxische Effekte auf

Zellen einer speziellen Zelllinie [murine Fibrosarkoma Zelllinie, WEHI 164 Subklon 13, (Espevik and Nissen-Meyer, 1986)]. Die Konzentration für das Zytokin IL-6 wurde durch eine dosisabhängige Stimulation des Zellwachstums einer B9 Hybridoma-Zelllinie bestimmt (Lansdorp et al., 1986). Die Überlebensrate und die Wachstumsrate der Zellen korrelierten direkt mit der biologischen Aktivität und demnach auch der Menge des jeweiligen Zytokins (Mosmann, 1983). Zur Quantifizierung der Zytokine bestimmte man die zellulären Reaktionen in diesem Assay über eine Farbreaktion. Gelbes MTT-Tetrazoliumsalzes [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) 2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid] wurde durch die Aktivität der Succinyl-Dehydrogenase in den Mitochondrien lebender Zellen zu dunkelblauen bis violetten MTT-Formazan-Kristallen umgesetzt. Die Formazan-Menge war dann direkt proportional zur Anzahl der lebenden Zellen (Mosmann, 1983, Ibelgaufs, 1995). Die Farbreaktion des MTT-Formazans findet nur in lebenden Zellen statt und ist folglich auch ein Maß für die Vitalität der Zellen. Nach Auflösung der Zellen und der Formazan-Kristalle durch eine Isopropanol-HCl-Lösung, konnte die Intensität dieser Farbreaktion durch Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Anregungswelle von 550 nm mit einem ELISA-Reader bestimmt werden.

Die für die Messung des IL-6 verwendeten B9-Zellen wurden in einem speziellen Wachstumsmedium mit einem Zusatz von 500 I.U. IL-6 Standard bei 37°C, 5% CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% im Brutschrank kultiviert. Die Passagierung der Zellen unter sterilen Bedingungen erfolgte alle drei Tage. Hierfür wurde 1 ml der zu passagierenden Zellsuspension mit 9 ml des Wachstumsmediums versetzt.

Die für die Messung von TNF- α verwendete WEHI-Zelllinie des Walter & Eliza Hall Instituts (WEHI 164, „subclone 13“) wurde zum Passagieren mit 12 ml sterilem PBS gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen durch eine Behandlung mit dem proteolytischen Enzym Trypsin (3 ml, 25%ig) durch dreiminütiges Schwenken vom Boden der Kulturflasche gelöst. Um die Trypsinaktivität wieder hemmen zu können, wurden danach 25 ml Wachstumsmedium hinzugegeben. Je 1,5 ml der so hergestellten, zellhaltigen Lösung wurden in zwei neue Kulturflaschen überführt. Daraufhin konnten die Zellen bei 37°C, 5% CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% im Brutschrank kultiviert werden. Nach drei Tagen sollten sich ca. 90% der Fibroblasten an den Boden der Kulturflasche angeheftet haben. Die Zellen konnten nun verwendet werden.

9.2.3. IL-6-Assay

Die Detektion von biologisch aktiven IL-6 erfolgte in mit der Hybridoma Zelllinie B9 vorgelegten sterilen 96-Well-Mikrotiterplatten. Die Zellen wurden mit Serumproben der Ratten oder den Überständen der Zellkultur inkubiert und durch das dort enthaltene bioaktive IL-6 zur Proliferation und somit zur Zunahme der Zellzahl angeregt (Aarden et al., 1987). Von der Anzahl der Zellen, die durch die Hinzugabe der entsprechenden Probe zur Proliferation und zum Wachstum angeregt werden, kann mit hoher Sensitivität direkt auf die Menge an bioaktivem IL-6 in der Probe geschlossen werden (Gearing, 1994). Die Detektionsgrenze liegt bei diesem Verfahren im Allgemeinen bei 3 I.U./ml (Ross et al., 2003). Um eine mögliche Verfälschung der Ergebnisse durch im Wachstumsmedium enthaltendes IL-6 ausschließen zu können, wurde die B9-Zellsuspension zunächst dreimal bei 2300 rpm

für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das entstandene Pellet in frischem Assaymedium ohne IL-6-Zusatz resuspendiert. Anschließend wurden 50 µl der Zellsuspension mit der Zählkammer nach Thoma (Auswertung von jeweils 80 Kleinstquadraten) ausgezählt, um den Verdünnungsfaktor für die Zellsuspension ausrechnen und die Zellzahl entsprechend einstellen zu können. Die eingesetzten 100 µl der Zellsuspension sollten 5000 Zellen enthalten. Die Zellzahl wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Verdünnungsfaktor} = \text{Zellzahl/Kammerfaktor} \times \text{ausgezählte Zellen}$$

Die gereinigte und nun auch vorverdünnte Zellsuspension wurde in die sterile 96-Well-Mikrotiterplatte überführt. Daraufhin wurden die Proben und Standards nach folgendem Schema hinzupipettiert:

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	blank	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	M
2	QK1	QK1	1:2	1:2	1:4	1:4	1:8	1:8	1:16	1:16	1:32	1:32
3	QK2	QK2	1:2	1:2	1:4	1:4	1:8	1:8	1:16	1:16	1:32	1:32
4	Probe	Probe	1:2	1:2	1:4	1:4	1:8	1:8	1:16	1:16	1:32	1:32
5	Probe	Probe	1:2	1:2	1:4	1:4	1:8	1:8	1:16	1:16	1:32	1:32
6	Probe	Probe	1:2	1:2	1:4	1:4	1:8	1:8	1:16	1:16	1:32	1:32
7	Probe	Probe	1:2	1:2	1:4	1:4	1:8	1:8	1:16	1:16	1:32	1:32
8	Probe	Probe	1:2	1:2	1:4	1:4	1:8	1:8	1:16	1:16	1:32	1:32

Abbildung 9-2

Pipettierschema für den IL-6 Bioassay in einer 96-Well Mikrotiterplatte

Reihe 1: A1=blank; B1 bis K1=1:2 Verdünnungsreihe des IL 6 Standards; L1=Kontrolle mit Medium (M) , **Reihe 2/3:** Verdünnungsreihen (1:2) der Qualitätskontrollen QK1 und QK2, **Reihe 4-8:** Verdünnungsreihen (1:2) der Proben (Doppelbestimmungen)

Es wurden Verdünnungsreihen (1:2) eines IL-6 Standards (100 I.U hrIL-6 in B1, 200 µl), zweier Qualitätskontrollen (QK1 mit 10 I.U./ml hrIL-6, 200 µl in A2 und QK2 mit 30 I.U/ml hrIL-6, 200 µl in B3) und der zu untersuchenden Proben hergestellt (A4 bis A8 und B4 bis B8, 200µl). Das Well A1 der Platte blieb leer (blank) und in das Well L1 wurde nur das Medium (M) pipettiert. Zur Verdünnung wurden je 100 µl in das darauffolgende Well pipettiert und mit weiteren 100 µl des Assaymediums versetzt (100 µl aus B1 in C1 und mischen, 100 µl aus C1 in D1 und mischen, usw.). Bei den beiden Qualitätskontrollen (Reihen 2 und 3) und den Proben (Reihen 4 bis 8) wurden Doppelbestimmungen

durchgeführt, weshalb in die ersten beiden Wells der Reihen die Originalkonzentration pipettiert wurde und dann je 100 µl in das übernächste Well überführt wurden (100 µl aus A3 in C3 und mischen, 100 µl aus B3 in D3 und mischen, usw.)

Beim letzten Verdünnungsschritt wurden 100 µl der Suspension verworfen, so dass in allen Wells das gleiche Volumen von 100 µl verdünnter Probenlösung vorlag. Nach 72 Stunden Inkubation der Zellen im Brutschrank (37°C, 5% CO₂, 95% Luftfeuchtigkeit) wurde in jedes zu messende Well 25 µl der MTT-Lösung pipettiert. Es folgte eine weitere Inkubation von 4 Stunden bei 37°C. Danach wurden 125 µl der Flüssigkeit eines Wells mit 100 µl der Isopropanol-HCl Mischung versetzt und für weitere 12 Stunden lichtgeschützt und bei Raumtemperatur inkubiert. Diese Lösung tötet die Zellen ab und löst den in den Zellen enthaltenen Farbstoff zur weiteren Bestimmung. Erst dann konnte die Messung der optischen Dichte bei 550 nm im ELISA-Reader durchgeführt werden.

9.2.3.1. Verwendete Puffer und Lösungen

Zellkultur-/Wachstumsmedium: 45 ml RMPI Medium 4 ml FKS (Fetales Kälberserum) 10 ng/ml Gentamycin (65 µl) 200 nmol/l Glutamin (0,5 ml) 200 mM/l Mercaptoethanol (125 µl) 10 I.U./ml Rekombinantes menschliches IL-6
Assaymedium (wie das Zellkulturmedium nur ohne IL-6-Standard)
100 I.U./ml IL-6 Standard
QK1: 10 I.U./ml (500 µl) und QK2: 30 I.U./ml (500 µl) Qualitätskontrollen
MTT-Lösung: 0,1g MTT in 20 ml PBS
Isopropanol/HCl-Lösung: 4 ml 2N HCl in 196 ml Isopropanol

Tabelle 9-4

Auflistung der für den IL-6-Bioassay verwendeten Puffer und Lösungen.

9.2.4. TNF- α -Assay

Zur Bestimmung der Konzentration des Zytokins TNF- α im Probenmaterial wurde ein fast identisches Verfahren angewendet. Die verwendeten WEHI-Zellen wurden durch dieses Zytokin allerdings nicht zum Wachstum angeregt, sondern abgetötet. Zunächst mussten die Zellen der murinen Fibrosarkom-Zelllinie aus den Kulturflaschen der Anzucht mittels Trypsin abgelöst werden (siehe Kapitel 9.2.2). Die Zellsuspension wurde dann unter sterilen Bedingungen dreimal für 10 Minuten bei 2300 rpm zentrifugiert und das Pellet in frischem Assaymedium resuspendiert. Entsprechend dem IL-6-Assay wurde der Verdünnungsfaktor

mit der Zählkammer nach Thoma bestimmt, die Zellsuspension wurde jedoch diesmal auf 50.000 Zellen/100 µl eingestellt und in die sterilen 96-Well-Mikrotiterplatten ausplattiert (siehe Kapitel 9.2.2). Es wurden 4 µg Actinomycin D pro ml Zellsuspension hinzugegeben, um ein zusätzliches Zellwachstum zu vermeiden und die Zellen gegenüber einer Wirkung von TNF-α zu sensibilisieren. Ein weiterer Unterschied zum IL-6 Bioassay bestand darin, dass die Zellen 24 h anstatt 72 h bei 37°C, 5% CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% im Brutschrank mit den zu untersuchenden Proben inkubiert wurden, nachdem die murinen TNF-α Standards, die beiden Qualitätskontrollen und die zu messenden Proben in den unterschiedlichen Verdünnungen nach dem obigen Schema in die Wells pipettiert wurden. Wie bereits beim IL-6 Bioassay geschildert, wurde auch hier nach der Inkubation der Zellen mit dem Probenmaterial in jedes zu messende Well der Platte 25 µl MTT-Lösung als Nachweis der Vitalität der Zellen pipettiert. Nach einer weiteren Inkubation von vier Stunden wurden jeweils 125 µl Flüssigkeit pro Well entnommen und durch 100 µl Isopropanol/HCl-Lösung ersetzt, damit die Zellen abgetötet und wasserunlöslichen Formazankristalle ausgewaschen werden konnten. Daraufhin erfolgte nochmals die Inkubation dieses Gemisches für 12 h lichtgeschützt und bei Raumtemperatur bis die 96-Well-Platte in den ELISA-Reader eingesetzt und die Detektion bei einer Wellenlänge von 550 nm durchgeführt werden konnte. Die Menge an aktiven TNF-α war umso höher, je weniger Formazan gebildet wurde. Bei diesem Versuch lag die Detektionsgrenze für biologisch aktives TNF-α bei 6 pg TNF-α/ml (Ross et al., 2003).

9.2.4.1. Verwendete Puffer und Lösungen

Zellkultur-/Assaymedium 500 ml RMPI Medium 55 ml FKS (Fetales Kälberserum) 5.000 I.U./ml. Penicillin/Streptomycin (5 ml) 200 nmol/l L-Glutamin (5 ml)
1000 pg/ml TNF-α Standard
QK1: 10 I.U./ml (500 µl) und QK2: 25 I.U./ml (500 µl) Qualitätskontrollen
MTT-Lösung: 0,1g MTT in 20ml PBS
Isopropanol/HCl-Lösung: 4 ml 2N HCl in 196 ml Isopropanol
Trypsin (25%): Fertiglösung 0,25% in PBS ohne Ca ²⁺ oder Mg ²⁺

Tabelle 9-5

Auflistung der für den TNF-α Bioassay verwendeten Puffer und Lösungen.

9.2.5. Auswertung

Um die Konzentrationen des Zytokins Interleukin 6 bzw. TNF- α in den entsprechenden Proben zu berechnen, wurde aus den Ergebnissen zur Bestimmung der optischen Dichte bei 550 nm unter Zuhilfenahme der Standards jeweils eine Eichkurve erstellt. Es wurden die gemessenen Werte der optischen Dichte in linearer Skala auf der y-Achse gegen die logarithmierten TNF- α bzw. IL-6-Konzentration auf der x-Achse aufgetragen (I.U./ml bzw. pg/ml). Zur Auswertung der Konzentrationen wurden nur Messungen aus dem linearen Bereich des Graphen verwendet, wo sich eine direkte (Anti-)Proportionalität zwischen der Zytokinkonzentration (Überlebens- bzw. Wachstumsrate der Zellen) und der photometrischen Messung ergab. Wenn die Werte außerhalb des linearen Bereichs lagen, wurde die Messung bei entsprechend angepasster Verdünnung in einem neuen Assay wiederholt. Für die Bestimmung von IL-6 war die Wachstumsrate der Zellen proportional zur bioaktiven IL-6-Konzentration in der Probe, wohingegen für TNF- α die Überlebensrate der Zellen antiproportional zur bioaktiven Menge an TNF- α in der entsprechenden Probe war. Durch die Regressionsgleichung der Eichkurven und den Verdünnungsfaktor konnten die Zytokinkonzentrationen der zu untersuchenden Proben berechnet werden.

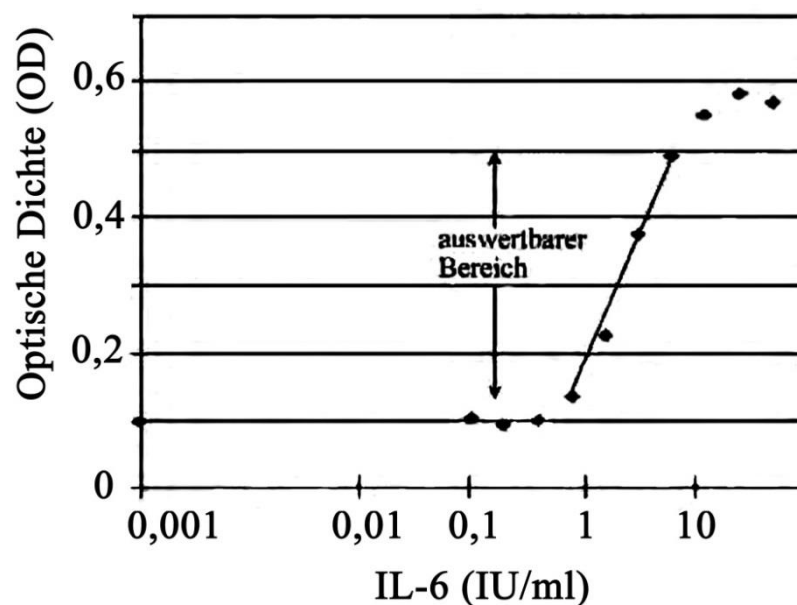


Abbildung 9-3

Exemplarische Eichkurve zur Quantifizierung des Zytokins Interleukin 6. Im linearen Teil der Kurve ist die Menge an bioaktivem IL-6 direkt proportional zur optischen Dichte (OD).

$$y = 0,1738 \ln(x) + 0,1738 \text{ und } R^2 = 0,9926$$

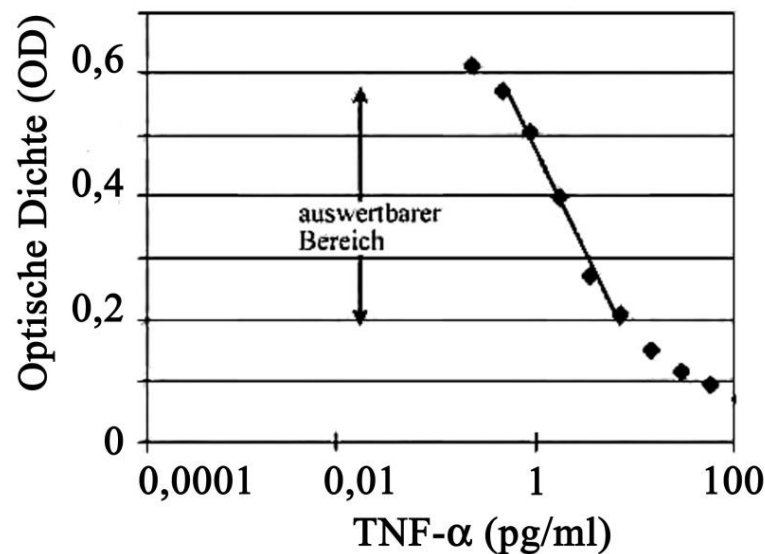


Abbildung 9-4

Exemplarische Eichkurve zur Quantifizierung des Zytokins Tumor Nekrose Faktor α . Im linearen Teil der Kurve ist die Menge an bioaktivem TNF- α antiproportional zur optischen Dichte (OD).

$$y = -0,14 \ln(x) + 0,45 \text{ und } R^2 = 0,98$$

9.2.6. Statistik

Zur statistischen Evaluierung der in den Bioassays ermittelten Konzentrationen der Zytokine TNF- α und IL-6 (sowohl aus den Überständen der HVL-Zellkultur als auch aus dem Blutplasma der Ratten) wurde eine einfaktorielle ANOVA mit anschließendem Newman-Keuls post-hoc-Test (Prism®) durchgeführt. Signifikante Unterschiede wurden mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ angezeigt und in den Abbildungen mit Symbolen entsprechend gekennzeichnet (Abbildung 13-1, B und C; Abbildung 14-2).

9.3. Quantitative Real-Time PCR

Mit dieser Methode („real time quantitative polymerase chain reaction“, PCR) kann die Expression relevanter Gene (z.B. NF-IL6, SOCS3, NF κ B, POMC) auf mRNA-Ebene ermittelt werden. Es wurde der Hypothalamus und die Hypophyse jeder einzelnen Ratte getrennt aus dem Open Field Stress Versuch (siehe Kapitel 8.7.2) untersucht. Voraussetzung für die Durchführung einer quantitativen Real-Time PCR ist die vorherige Extraktion von RNA aus den Zellen des zu untersuchenden Gewebes (Hypothalamus- oder Hypophysengewebe) und die Herstellung von cDNA („complementary DNA“) mittels reverser Transkription, welche das Ausgangsmaterial für die eigentliche quantitative (q)PCR darstellt. In der qPCR können nämlich nur DNA-abhängige Polymerasen verwendet werden. Deshalb wird zunächst durch reverse Transkription mittels RNA-abhängiger DNA-Polymerasen mRNA in cDNA übersetzt, damit indirekt in einem zweiten Schritt die Menge an mRNA ermittelt werden kann (Mühlhardt, 2009).

9.3.1. RNA-Extraktion und -Aufbereitung

Die Extraktion von RNA aus Gehirngewebe sollte, wie oben bereits erwähnt, die Untersuchung der Expressionsaktivität von Zellen zu einem bestimmten Zeitpunkt ermöglichen, da ja nur die Gene, die aktuell in der Zelle transkribiert wurden als mRNA vorliegen. Bei der sogenannten „single step“-Methode (Mühlhardt, 2009) erhielt man eine bestmögliche RNA-Menge von 1-1,5 µg RNA/mg Gehirngewebe. Das gewonnene Gewebe für die RNA-Extraktion wog zwischen 15-80 mg (Kapitel 8.8.5). Der gesamte Arbeitsplatz sowie die verwendeten Gerätschaften für die RNA-Extraktion wurden mit RNase ZAP® und 100%igem Ethanol gereinigt. So wurde verhindert, dass die zu gewinnende RNA durch RNasen kontaminiert und abgebaut wurde. Das DEPC-Wasser wurde durch das Versetzen von Aqua dd. mit Diethylpyrocarbonat hergestellt (1 ml DEPC/Liter Wasser, 24 h Inkubation unter Rühren). Die RNasen wurden hierbei durch das Eingehen von kovalenten Bindungen an primäre und sekundäre Amine inaktiviert (Hedrick, 1997). Beim darauffolgenden Autoklavieren wurde das DEPC inaktiviert.

Tag	Arbeitsschritt	Dauer	Zweck
1	Hinzufügen von eiskaltem Trizol zur noch gefrorenen Probe 500 µl für 50 mg Gewebe oder 1000 µl für 50-100 mg Gewebe mechanische Zerkleinerung des Gewebes mittels Ultraschall (Amplitude 40%)	10-15 s	Homogenisierung/ Auflösung des Gewebeverbandes, Zellaufschluss durch Phenol und TRIzol®, Inaktivierung endogener RNAsen, Aufbrechen von Nukleoproteinkomplexen
	Eintauchen des Ultraschallkopfes in 70% igen Ethanol und dann in DEPC-Wasser	jeweils 5 s	Reinigung des Ultraschallkopfes zwischen jeder Probe
	Zentrifugieren jeder Probe bei 12000 rpm und 4°C	10 min.	Trennung von Fetten im Überstand und Bestandteilen der extrazellulären Matrix, Polysacchariden und DNA im Bodensatz
	Abnehmen des 1. Überstandes und Überführen in ein neues Reaktionsgefäß (1,5 ml), Rest verwerfen		
	Inkubation bei Raumtemperatur	5 min.	Dissoziation von Nukleoproteinen
	Zugabe von Chloroform (organisches Lösungsmittel), 100 µl pro 500 µl TRIzol ausgiebig mischen		Chloroform löst denaturierte Proteine und DNA
	Separation bei Raumtemperatur	3 min.	
	Zentrifugation jeder Probe bei 12000 rpm und 4°C	20 min.	Phasentrennung in eine klare, wässrige Phase mit RNA und in eine organische Phase mit DNA und Proteinen
	Abnehmen des 2. klaren Überstandes und Überführen in ein Isopropanol gefülltes Reaktionsgefäß (1,5 ml) 250 µl pro 500 µl TRIzol		gelartige Phase aus DNA und Proteinen bleibt zurück und wird verworfen

	Mischen durch vortexen	10 s	
	Ausfällen bei -20 °C	20-24 h	RNA als Niederschlag sichtbar
2	Zentrifugieren jeder Probe bei 1500 rpm und 4°C, Dekantieren des Überstands	15 min.	Es entsteht ein sichtbares Pellet
	1. Waschschrift mit 1 ml 70%igen Ethanol		Entfernung von Isopropanol bzw. Ethanolresten, dabei ist darauf zu achten, das Pellet nicht zu verlieren
	Zentrifugieren jeder Probe bei 1500 rpm und 4°C, Dekantieren des Überstands	10 min.	
	2. Waschschrift mit 1 ml 100%igen Ethanol, Dekantieren des Überstands		
	Trocknen des Pellets	20-25 min.	staubfrei
	RNA-Pellet je nach Größe in 20-100 µl DEPC Wasser lösen		

Tabelle 9-6**RNA-Extraktion- und Aufbereitung mit der „single step“ Phenol-Chloroform Methode.**

Durch die Messung in einem Photometer wurde die RNA-Konzentration der angesetzten Lösung bestimmt. Dafür wurden die Proben zunächst 1:20 vorverdünnt (6 µl sample + 114 µl autoklaviertes Wasser). Die jeweilige Probe wurde in eine Küvette gefüllt, in das Gerät eingesetzt, mit Licht einer Wellenlänge von 260 nm bestrahlt und die Absorption bzw. Extinktion der Lösung gemessen. Der Wert wurde als optische Dichte (OD) angegeben und ist ein Indikator für die RNA-Menge in der Probe. Eine OD von 1 kommt bei einem pH von 7 einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml gleich (RNA-Konzentration der Messlösung = OD 260x40 µl/ml). Zusätzlich musste auch die Reinheit der Probe bestimmt werden, indem man diese mit Licht der Wellenlänge 280 nm bestrahlte und dann diesen Messwert in folgende Rechnung einsetzte: OD260/OD 280. Das Ergebnis sollte zwischen 1,9 und 2,1 liegen. Alle Ergebnisse unter 1,6 bedeuteten, dass möglicherweise eine Verunreinigung mit Proteinen oder Phenol vorlag und diese Probe nicht für die cDNA Synthese durch reverse Transkription verwendet werden konnte. Danach wurden alle Proben jeweils auf eine Endkonzentration von 250 ng/µl verdünnt, um gleiche Mengen an Ausgangsmaterial der RNA für die reverse Transkription und damit die darauffolgende relative Quantifizierung mittels Real-Time PCR zu erhalten.

RNA-Konzentration der Messlösung [RNA]M	$[RNA]M = OD_{260} \times 40 \text{ µg/ml}$
Tatsächliche Konzentration der Probe [RNA]T	$[RNA]T = [RNA]M \times 20$
Volumen an DEPC-H2O zum Erreichen der Endkonzentration	$(PV \times [RNA] / 250 \text{ ng / µl}) - PV$ (PV= verbleibendes Probenvolumen)

Tabelle 9-7

Verwendete Rechnungen zur Ermittlung der RNA-Konzentration und zur Verdünnung der Proben auf eine einheitliche Endkonzentration von 250 ng/µl.

9.3.2. Reverse Transkription und cDNA-Synthese

Bezeichnung	Zusammensetzung
Diethylpyrocarbonat (DEPC)-Wasser	0,1% DEPC in Aqua dd., autoklaviert nach 24-stündigem Rühren bei RT
RT-Mix I (Reaktionsmix, Ansatz pro 1 µg RNA) für die cDNA-Synthese	5 µl DEPC Wasser 1 µl Random Hexamers 1 µl dNTPs
RT- Mix II (cDNA Primer Mix, Ansatz pro 1 µg RNA)	4 µl 5x First Strand Buffer 2 µl steriles Wasser 2 µl 0,1M DTT (Dithiothreitol) 1 µl M-MLV RT (Reverse Transkriptase aus dem „moloney murine leukemia virus“)

Tabelle 9-8

Verwendete Chemikalien und Reaktionsmische für die cDNA-Synthese.

Wenn die RNA aus dem Gehirngewebe extrahiert und die Reinheit der Probe nachgewiesen war, musste die gewonnene RNA in cDNA durch reverse Transkription umgeschrieben werden. Zum Starten des cDNA Stranges wurden sogenannte random Hexamer-Oligonukleotide verwendet. Der entstehende cDNA-Einzelstrang war zur ursprünglichen mRNA komplementär und wurde durch eine RNA-abhängige DNA-Polymerase synthetisiert (Mühlhardt, 2009).

Arbeitsschritt	Vorgehensweise, Konditionen	Dauer
Ansetzen des Mixes	4 µl RNA (entspricht 1 µg) mit 7 µl RT-Mix I in jedes Reaktionsgefäß	
Erhitzen des Ansatzes	bei 65°C, real-time Cyclor	10 min
Abkühlen des Ansatzes	auf Eis (4°C)	
Hinzufügung des RT-Mix II	9 µl RT-Mix II in jedes Reaktionsgefäß	
Erwärmen	bei 37°C, real time Cyclor	60 min.
Erhitzen	bei 90°C, real-time Cyclor	5 min
Abkühlen des Ansatzes	auf Eis (4°C)	
Verdünnung	1:20 mit autoklaviertem Wasser	
Lagerung bei -22°C	cDNA kann in der real-time PCR eingesetzt werden (1 µl dieser Lösung entspricht der cDNA die aus 50 ng Gesamt-RNA gewonnen wurde)	

Kontrollen	1 Reaktionsgefäß mit 4 µl DEPC-Wasser anstatt der RNA (blank 1) 11 µl DEPC Wasser anstatt 7µl RT-Mix I und 4 µl RNA (blank 2)
------------	--

Tabelle 9-9**Protokoll der cDNA-Synthese durch reverse Transkription.****9.3.3. Grundlagen der quantitativen Real-Time PCR**

Folgende Beschreibung basiert auf Angaben des Herstellers Applied Biosystems: (http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_085696.pdf)

Die quantitative Real-Time PCR unterscheidet sich von der „konventionellen PCR“ dadurch, dass zusätzlich eine gleichzeitige Quantifizierung der hergestellten DNA möglich ist. Bei allen anderen gängigen PCR-Methoden kann der Erfolg erst nach Beendigung der PCR quantifiziert werden, indem man jeweils ein Aliquot des Ansatzes auf ein Agarosegel aufträgt, gelelektrophoretisch auftrennt und anschließend eine Sichtbarmachung unter UV-Licht mittels eines Farbstoffes wie Ethidiumbromid durchführt (siehe Kapitel 7.1.9.3). Bei der quantitativen Real-Time PCR werden sogenannte FRET-Sonden verwendet (Abbildung 9-5), die an eine Ziel-DNA-Sequenz binden und an deren 5'-Ende der Reporter-Farbstoff und am 3'-Ende der Quencher-Farbstoff gebunden sind. Der sog. Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) bedeutet, dass ein Donor-Fluorochrom F1 [oder im Zusammenwirken mit Taqman®-Sonden Reporter genannt, (to report = berichten)] durch das Licht einer spezifischen Wellenlänge (Anregungswelle A1) angeregt wird und daraufhin die Emissionswellenlänge E1 emittiert. Wenn sich ein Akzeptor-Fluorochrom F2 [oder im Zusammenwirken mit Taqman®-Sonden Quencher genannt, (to quench = löschen)] in ausreichender Nähe befindet, kann die zuvor freigewordene Energie praktisch verlustfrei an den Akzeptor abgegeben werden, wodurch dieser die Emissionswellenlänge E2 abstrahlt. Das bedeutet, dass die Fluoreszenz E1 des Donors unterdrückt oder auch „gequench“ wird und nur E2 messbar ist. Falls sich F1 und F2 jedoch nicht nahe genug sind, nimmt FRET ab (E1 nimmt entsprechend zu bzw. E2 entsprechend ab) und die Fluoreszenz E1 wird nicht mehr ausgelöscht und wird messbar.

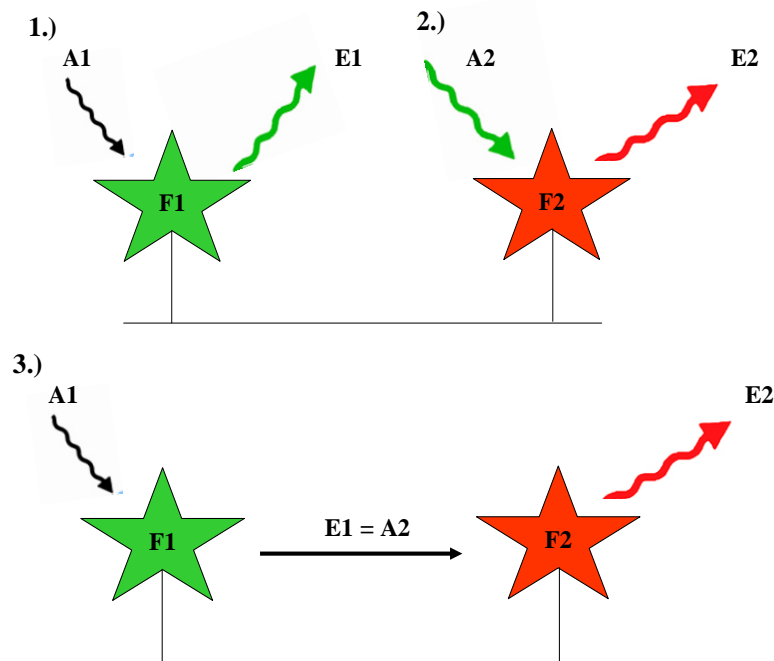


Abbildung 9-5

Prinzip des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET)

Ein Donor-Fluorochrom F1 wird durch das Licht einer spezifischen Wellenlänge (Anregungswelle A1) angeregt und daraufhin wird die Emissionswellenlänge E1 emittiert (1.). Wenn sich ein Akzeptor-Fluorochrom F2 in ausreichender Nähe befindet, kann die zuvor freigewordene Energie praktisch verlustfrei an den Akzeptor abgegeben werden, wodurch dieser die Emissionswellenlänge E2 abstrahlt (3.). Das bedeutet, dass die Fluoreszenz E1 des Donors unterdrückt wird und nur E2 messbar ist. Falls sich F1 und F2 jedoch nicht nahe genug sind, nimmt FRET ab (E1 nimmt entsprechend zu bzw. E2 entsprechend ab) und die Fluoreszenz E1 wird nicht mehr ausgelöscht und wird messbar) (2.).

Abbildung modifiziert nach (Livak et al., 1995, Damm, 2012).

Die verwendete DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) besitzt die besondere Eigenschaft der 5'-3' Exonuklease-Aktivität. Das bedeutet, dass nach dem sequenzspezifischen Anlagern der Primer und der Sonde an den Matrizenstrang, die Sonde im Verlauf der Synthese des komplementären DNA-Stranges von der Taq-Polymerase hydrolysiert wird. Reporter und Quencher werden somit schlagartig räumlich voneinander getrennt und der Resonanztransfer wird beendet. Die Intensität von E1, die proportional zur Akkumulation des spezifischen PCR-Produktes ansteigt, nimmt mit jedem Zyklus zu und kann detektiert werden (Wickert, 2007). In der vorliegenden Arbeit wurden TaqMan®-Sonden (aus den TaqMan® Gene Expression Assays von Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) mit einem „minor groove binder“ (5'-MGB) und einem „nonfluorescent quencher“ (3'-NFQ) verwendet. Die Verwendung eines NFQ und eines MGB führt zu einer Verminderung der Hintergrundfluoreszenz und somit zu einer erhöhten Sensitivität des Assays (Kutyavin et al., 2000). Die Sonde im β -Aktin Assay war mit VICTM (Fluoreszenzfarbstoff) markiert und die anderen mit FAM® (6-Carboxy-Fluorescein).

9.3.4. Durchführung der quantitativen Real-Time PCR

Zusammensetzung des Real-Time Mix für die RT-PCR (Ansatz pro Well): 3,5 µl steriles Wasser, 5 µl Mastermix und 0,5 µl Primer.

Protokoll der Real-Time PCR	
Vorlegen 9 µl des Real-Time Mixes pro Well in die 96 Mikrotiterplatte, Kontrollen (blank 1 und blank 2), 1 µl autoklaviertes Wasser (blank 3)	
Zugabe von 1 µl der cDNA pro Well (außer blank 1-3)	
Programm im Real-Time cycler (StepOnePlus Gerät)	
Aktivierung der DNA-Polymerase 50°C, 2 min.	
für 35-44 Zyklen	Denaturierung und Trennung der doppelsträngigen DNA bei 95°C, 15 s
	Annealing (Anlagerung der Primer an die DNA) und Elongation (Amplifikation) bei 60°C, 30 s

Tabelle 9-10

Protokoll der Real-Time PCR.

9.3.5. Die verwendeten Primer

Assay-ID	Gen (<i>Ratus norvegicus</i>)
4352340E Rat ACTB Endogenous Control (VIC/MGB Probe, Primer Limited)	β-Aktin (Referenzgen)
Rn00824635_s1	NF-IL6
Rn01473658_g1	IκBα
Rn00585674_s1	SOCS3
Rn00595020_m1	POMC

Tabelle 9-11

Auflistung der untersuchten Gene für die RT-PCR.

9.3.6. Auswertung und Statistik der Real-Time PCR

Um die relative Expression der für die vorliegende Arbeit relevanten Zielgene im Verhältnis zu einer Referenzgruppe bestimmen zu können, wurde die Delta C_T -Methode (Livak and Schmittgen, 2001) angewendet („relative quantity“ = RQ).

Durch die Verwendung des C_T -Wertes („cycle threshold“ oder Schwellenwert-Zyklus) in der Auswertung, wird zu Beginn der exponentiellen Phase der PCR eine Quantifizierung vorgenommen. Der C_T -Wert ist nämlich der Zeitpunkt bzw. der Zyklus direkt bei Beginn der exponentiellen und somit quantifizierbaren Amplifizierung eines Gens, wo die Fluoreszenz

erstmalig einen festgelegten Schwellenwert überschreitet bzw. signifikant über der Hintergrundfluoreszenz liegt (Abbildung 9-6). Es wurde für jede zu untersuchende Probe eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die C_T -Werte wurden über die Expression eines Referenzgens (in unserem Fall β -Aktin) normiert. Das Referenzgen wird relativ konstant im Gewebe exprimiert und sollte von den Versuchsbedingungen unbeeinflusst bleiben (Pfaffl, 2004). Damit konnten eventuelle Unterschiede in der eingesetzten Ausgangsmenge an cDNA ausgeglichen werden. Als Kalibrator wurde eine Probe der Kontrollgruppe verwendet, die den kleinsten C_T -Wert (basale Expression des Gens) aufwies (Wickert, 2007). Die Berechnung der $\Delta\Delta C_T$ -Werte erfolgte, indem der ΔC_T -Wert [Differenz zwischen Referenzgen (β -Aktin) und Zielgen] der jeweils am niedrigsten exprimierten Probe (Kalibrator) von den ΔC_T -Werten der übrigen Proben subtrahiert wurde. Die n-fache Transkription von Kontrollgruppe zu Versuchsgruppe errechnet sich dann mit der Formel $2^{-\Delta\Delta C_T}$.

Voraussetzung war allerdings, dass in jedem Zyklus eine Verdopplung der Probenmenge stattgefunden hatte. Das heißt, dass eine optimale Effizienz von 100% (Pfaffl, 2004, Wickert, 2007) oder 1 (Livak and Schmittgen, 2001) vorlag. Eine optimale Effizienz wurde in den von Applied Biosystems angebotenen Gene Expression Assays vorgetestet und unter Verwendung der Originalprodukte garantiert (Information des Herstellers).

Es wurden mittels einfaktorieller ANOVA mit anschließendem Newman-Keuls post-hoc-Test jeweils alle Versuchsgruppen miteinander verglichen und auch hier ein minimales Signifikanzniveau von $P < 0,05$ verwendet (Abbildung 13-12; Abbildung 13-13).

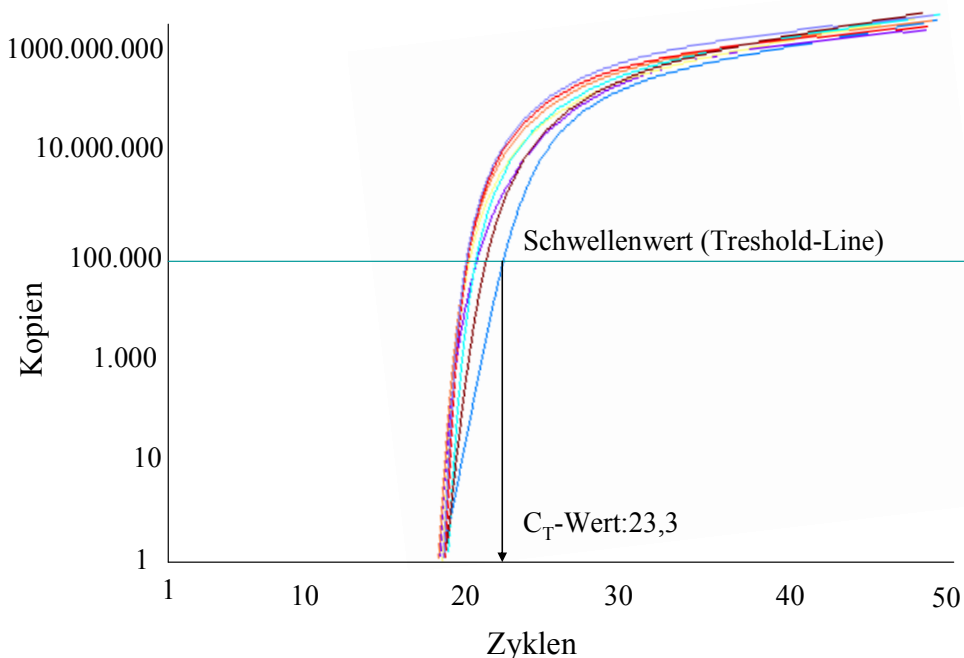


Abbildung 9-6

Die Abbildung zeigt die Herleitung des C_T -Wertes: Zeitpunkt bzw. der Zyklus direkt bei Beginn der exponentiellen und somit quantifizierbaren Amplifizierung eines Gens, wo die Fluoreszenz erstmalig einen festgelegten Schwellenwert überschreitet bzw. signifikant über der Hintergrundfluoreszenz liegt.

Abbildung modifiziert nach: Applied Biosystems „Real-Time PCR vs. Traditional PCR vs. Digital PCR“.

10. In vitro Versuche

10.1. Primäre Zellkultur des Hypophysenvorderlappens (HVL)

10.1.1. Versuchsaufbau

Um das interaktive Zusammenspiel von Immunsystem und neuroendokrinem System im Hinblick auf pathologische Ereignisse wie eine Entzündung oder eine Infektion untersuchen zu können, wurden nach Gewinnung und Kultivierung der HVL-Zellen einer adulten Ratte die Wirkung verschiedener Zytokin-Antikörper bzw. der Zytokine selbst (Kontrollsubstanz: Medium, in welchem die Zellen heranwuchsen) getestet. Darüber hinaus wurde der JAK-STAT-Inhibitor AG490 (Kontrollsubstanz: Cremophor) verwendet. Nach einer 30-minütigen Inkubation mit dem jeweiligen Antikörper wurden die Zellen für 6 h mit LPS (100 µg/ml) stimuliert und daraufhin mit 4%igem PFA fixiert, um weitere immunzytochemische Untersuchungen (siehe Kapitel 9.1) vornehmen zu können. Die Bioaktivität der Zytokine TNF- α und IL-6 wurden im Überstand des Mediums, welches vor der Fixation der Zellen gewonnen wurde, bestimmt (siehe Kapitel 9.2).

10.1.1.1. Verwendete Lösungen und Puffer

Zellkulturmedium 43,5 ml DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 5 ml FKS 1 ml Glutamin 500 µl Penicillin/Streptomycin Die Lösung wird bei 37°C warmgestellt.	
EBSS (Earle's Balanced Salt Solutions)	Die Lösungen EBSS und HBSS werden vor der Präparation der Hypophysen für 20 Minuten über eine CO ₂ -Flasche mittels Schlauchsystem und Kanüle oxygeniert.
HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution) In 40 ml HBSS werden 1,6 ml HEPES (20 mM) hinzugegeben.	
2 mg Trockensubstanz der Dispase I werden in 1 ml HBSS-Puffer (20 mM Hepes) gelöst, ergibt die Gebrauchslösung, 37°C. Enzymaktivität: 2 I.U./ml	
Inaktivierungslösung 10 ml begaste HBSS mit 20 mM Hepes 1 mM EDTA (100 mM-Stock, sterilfiltriert), 37°C.	

Tabelle 10-1

Auflistung der für die Zellkultur verwendeten Lösungen und Puffer.

10.1.2. Protokoll der Erstellung der primären Zellkultur des HVL

10.1.2.1. Vorbereitungen

Die als Zellkulturkammerwände verwendeten Flexiperm R-Mikro-12-Blöcke (Grundfläche 28 mm²) wurden zur besseren Handhabung in einzelne Mikrokammern geschnitten, für 30

Minuten in 70%igem Ethanol sterilisiert und zum Trocknen in eine sterile Petrischale gelegt. Mit Hilfe einer Pinzette wurden die sterilen Deckgläschen (Fläche 225 mm², Dicke 0,1 mm), die als Kammerboden und Adhäsionsmatrix für die Zellen des HVL dienten, auf die glatten Seiten der abgetrockneten Zellkulturkammerwände gelegt. Anschließend wurden diese mit einer Pinzette in der Petrischale herumgedreht und die Deckglasböden mit ca. 200 µl Poly-L-Lysin (0,1 mg/ml) über Nacht (12-24 h) bei 4°C beschichtet. Die Petrischalen wurden zum Schutz vor Licht in Alufolie eingepackt. Am nächsten Tag wurde das überschüssige Poly-L-Lysin mit einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt, die Kammern mit sterilem Aqua dd. gewaschen und unter der Laminar lichtgeschützt getrocknet.

10.1.2.2. Präparation der Hypophyse

Bei der Präparation wurden hitze- oder ethanolsterilisierte Instrumente verwendet, um einer Verunreinigung der Kultur durch Bakterien vorzubeugen. Alle weiteren Schritte wurden nach Möglichkeit unter der Sterilbank durchgeführt und die Pipettenspitzen sowie Reaktionsgefäße waren autoklaviert. Zwei bis drei adulte Ratten (Wistar, aus institutseigener Zucht, männlich, 250-300 g, 12 Wochen alt) wurden mit 0,3 ml Narcoren® (Pentobarbital 64 mg/kg Körpergewicht) i.p. injiziert. Die tief narkotisierten Ratten wurden mit der Guillotine dekapitiert und der Kopf direkt in ein Becherglas mit eisgekühltem PBS überführt. Anschließend wurde dieser zur Präparation auf frischen Zellstoff gelegt. Mit einem Skalpell wurde die Kopfhaut bis zwischen die Augen sagittal eingeschnitten. Die Haut wurde von der Schädeldecke abpräpariert und zur Seite geklappt. Mit einem kleinen Rongeur wurden die am Kopf verbliebenen Halswirbel, sowie die Halsmuskulatur entfernt und vom *Foramen magnum* ausgehend wurde die Schädeldecke so abgetragen, dass man eine gute Aufsicht auf das Gehirn hatte. Mit einem Spatel wurde nun das Gehirn an der *Medulla oblongata* beginnend vom Knochen abgehoben, die Sehnerven durchtrennt und die Bulbusfäden aus dem Siebbein gelöst, so dass das Gehirn entnommen werden konnte. Mit einer kleinen Schere wurden die Hirnhäute über der Hypophyse aufgeschnitten, damit diese mit dem Spatel aus der entstehenden Tasche zwischen den Hirnhäuten und der Hypophysengrube herausgenommen werden konnte. Die Hypophysen wurden in kleine Petrischalen, die mit gekühltem EBSS gefüllt waren, überführt.

10.1.2.3. Präparation des HVL

Nacheinander wurden die einzelnen Petrischälchen unter einem Binokular angeschaut und die Hypophysen so herumgedreht, dass der HHL nach oben zeigte. Mit einer kleinen Pinzette wurde die Hypophyse in dieser Position fixiert und mit einer zweiten Pinzette manipuliert, um Hinter- und Zwischenlappen vom Vorderlappen zu lösen. Das herausgenommene Vorderlappenstück wurde mit Hilfe einer sterilen, abgeschnittenen Glaspipette in eine kleine mit HBSS (20 mM Hepes) gefüllte Petrischale überführt. Anschließend wurden die Stücke unter der sterilen Werkbank mit Hilfe einer Eppendorf Pipette mit abgeschnittener Spitze in die Dispase-Lösung verbracht.

10.1.2.4. Verdau durch die Dispase-Lösung

Zur Isolierung einzelner Zellen war das Herauslösen aus dem Gewebeverband durch ein enzymatisches Dissoziationsverfahren erforderlich. Zur Verdauung der Matrixproteine der interzellulären Verbindungen wurde die Protease Dispase I verwendet. Die Gewebestücke des HVL wurden für 90 Minuten in der Dispase I-Lösung (ca. 2 I.U./ml) mit Carbogen-Begasung bei 37°C im Wärmeblock inkubiert (Frangakis et al., 1982, Frangakis and Kimelberg, 1984). Nach 30 und 60 Minuten wurde das Gewebe kurz aufgeschüttelt. Währenddessen wurden die Kulturkammern sowie das DMEM zum Vorwärmen in den Brutschrank gestellt.

10.1.2.5. Enzyminaktivierung

Die Enzymlösung wurde mit Hilfe einer Pipette vorsichtig entfernt, anschließend wurden 5 ml der Inaktivierungslösung hinzugegeben. Es erfolgte die Zentrifugation bei 1000 rpm für 5 Minuten. Dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt. Beim abschließenden Waschschrift wurde die Inaktivierungslösung ein letztes Mal abgesaugt und 5 ml DMEM aufgefüllt. Durch leichtes Klopfen an das Röhrchen kam es zur Auflockerung des Gewebes. Danach wurde bei 1000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert und das Medium abgenommen, um erneut mit DMEM auf 5 ml aufgefüllt zu werden.

10.1.2.6. Dissoziieren der Zellen (mechanische Zerkleinerung)

Mithilfe einer sterilen, blauen Pipettenspitze wurde das Gewebe durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren unter Vermeidung von Luftblasen dissoziiert und somit die Zellen vereinzelt (Jurzak et al., 1994, Gebke et al., 1998). Nach nahezu vollständiger Dissoziation (Fehlen sichtbarer Gewebefragmente und eine milchig trübe Konsistenz) wurde die Zellzahl der Suspension in einer Neubauer Zählkammer durch Auszählen von 10 Kleinstquadraten bestimmt und auf etwa 3 Millionen Zellen/ml verdünnt, um anschließend in die im Inkubator bei 37°C vorgewärmten Zellkulturkammern überführt zu werden (jeweils 350 µl pro Zellkulturkammer). Diese wurden in Petrischalen in den Zellinkubator gestellt (37°C, 5% CO₂, 95% Luftfeuchtigkeit).

10.1.2.7. Versorgung der Zellen

Die Versorgung der Zellen mit neuem DMEM erfolgte ein Tag nach der Präparation, um Zelltrümmer und abgestorbene Zellen zu entfernen. Einen Tag vor dem geplanten Versuch wurde das serumhaltige durch ein serumfreies Medium ausgetauscht. Das frische Medium wurde zuvor jedes Mal im Heizblock auf 37°C erwärmt.

10.1.2.8. Verwendung der Zellen

Nach einer Kultivierung von fünf Tagen und anschließender Entfernung der Kammerwände konnten die auf den Deckgläschen gewachsenen Zellen für Versuche und anschließende immunzytochemische Untersuchungen verwendet werden (siehe Kapitel 9.1.3).

10.1.2.9. Stimulation der Zellen

Verwendete Substanzen			
Substanz	Konzentration	Kontrollsubstanz	Firma
TNF- α -Antikörper	1 μ l/350 μ l	serumfreies Medium	National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC) Gabe von Giamal N. Luheshi, Douglas Institut, Universität Montreal, Kanada
IL-1 β	10 μ l/350 μ l	serumfreies Medium	
IL-6-Antikörper	10 μ l/350 μ l	serumfreies Medium	
IL-10-Antikörper	10 μ l/350 μ l	serumfreies Medium	
AG490	1,5 μ g/ μ l, 5 mM AG 490- Lösung(100 μ M): in serumfreien Medium 1:50	Cremophor® EL 25% in PBS Cremophor-Lösung: in serumfreien Medium 1:50	Enzo Life Sciences International Inc. und Sigma Aldrich, München

Tabelle 10-2

Auflistung der für die Stimulation der Zellen der primären HVL-Kultur verwendeten Substanzen und Kontrollsubstanzen.

10.1.2.9.1. Zytokin-Antikörper und weitere verwendete Substanzen

Nachdem die Zellen fünf Tage herangewachsen waren, wurde am Versuchstag um 9.00 Uhr morgens das bisherige serumfreie Medium abgenommen und für weitere Untersuchungen in sterile 1,5 ml Eppendorf Tubes gefüllt. Dann wurden die Zellen einmal mit serumfreien Medium gewaschen und mit der entsprechenden Zytokin-Antikörper-Medium-Lösung für 30 Minuten im Brutschrank inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen um 10.00 Uhr mit 100 μ g/ml LPS für weitere 6 h inkubiert. Um 16.00 Uhr des Versuchstages wurde das Medium steril abgenommen und für eine biochemische Messung der Zytokine TNF- α und IL-6 in 1,5 ml Eppendorf Tubes pipettiert. Die Zellen wurden mit eiskaltem 4%igem PFA fixiert und waren nach dem darauffolgenden dreimaligen Waschen mit eiskaltem PBS für 14 Tage im Kühlschrank haltbar und für weitere Auswertungen nutzbar (Abbildung 10-1).

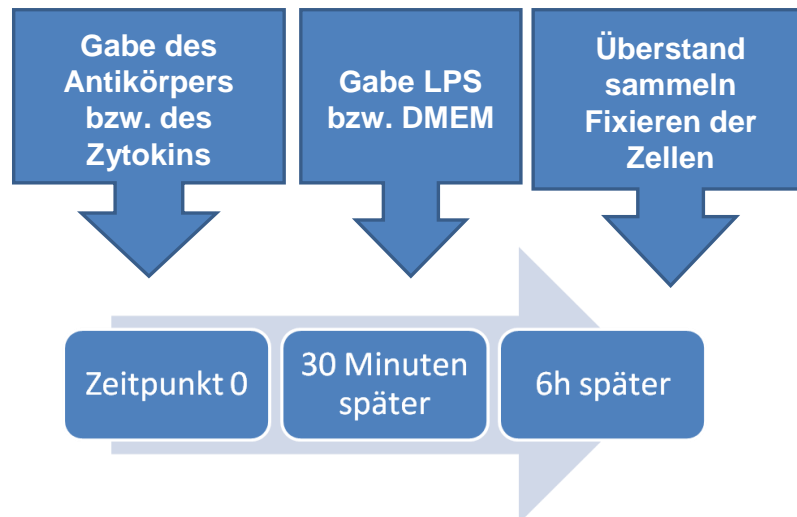


Abbildung 10-1

Versuchsaufbau: Stimulation der HVL-Zellen mit LPS (Kontrollsubstanz: serumfreies Medium) und vorheriger Inkubation mit einem Zytokin-Antikörpern bzw. dem Zytokin selbst.

10.1.2.9.2. Der JAK-STAT- Inhibitor AG490

Bei der Verwendung von AG490 wurde genauso vorgegangen wie bei der Inkubation mit den Zytokin-Antikörpern bzw. dem Zytokin selbst. Das heißt, dass das AG490 bzw. die Kontrollsubstanz Cremophor für 30 Minuten im Brutschrank inkubiert wurden und daraufhin eine Stimulation mit LPS oder der Kontrollsubstanz PBS über einen Zeitraum von 6 h erfolgte. Nach Beendigung des Versuches wurden zum einen die Überstände abgenommen und eingefroren und zum anderen die Zellen für weitere Untersuchungen fixiert und gekühlt aufbewahrt (siehe oben).

III. ERGEBNISSE

11. Qualitative Auswertung der NF-IL6 Immunreaktivität in ausgewählten Regionen des Mäusegehirns

Die für diese Arbeit relevanten Regionen des Mäusegehirns, namentlich der Hypothalamus und die Hypophyse, wurden immunhistochemisch untersucht und die NF-IL6-immunreaktiven Zellen charakterisiert. In der präoptischen Region und weiteren Regionen des Hypothalamus zeigten sich 8 Stunden nach LPS-Stimulation (100 µg/kg KGW) vor allem im Bereich der sensorischen Circumventrikulären Organe (sCVO's, OVLT, SFO, ME) NF-IL6-immunreaktive Zellen (Abbildung 11-1, A, B, E, F, I und J). Auch im PVN (Abbildung 11-1, G und H) und im SON (Abbildung 11-1, C und D) konnten nach LPS-Stimulation deutliche NF-IL6-Signale detektiert werden. Des Weiteren waren NF-IL6-immunreaktive Zellkerne auch im *Plexus choroideus* (ChP) (Abbildung 11-2, D) und generell in Kapillaren bzw. größeren Gefäßen des gesamten Gehirnparenchyms zu finden (Abbildung 11-2, A und B). Eine konstitutive Expression von NF-IL6 zeigte sich im Hippocampus des Vorderhirns, wobei die Signale im Hippocampus nicht erkennbar durch eine LPS-Stimulation beeinflussbar bzw. intensivierbar waren (Abbildung 11-2, C). Einige Signale waren auch in PBS-stimulierten Kontrolltieren der anderen untersuchten Gehirnstrukturen zu beobachten, allerdings in geringerer Anzahl und Intensität. Bezüglich der NF-IL6-Immunreaktivität nach LPS-Stimulation in den verschiedenen Gehirnregionen konnten in der vorliegenden Arbeit fast keine speziesspezifischen Unterschiede zwischen den Mäuse- und Rattengehirnen festgestellt werden.

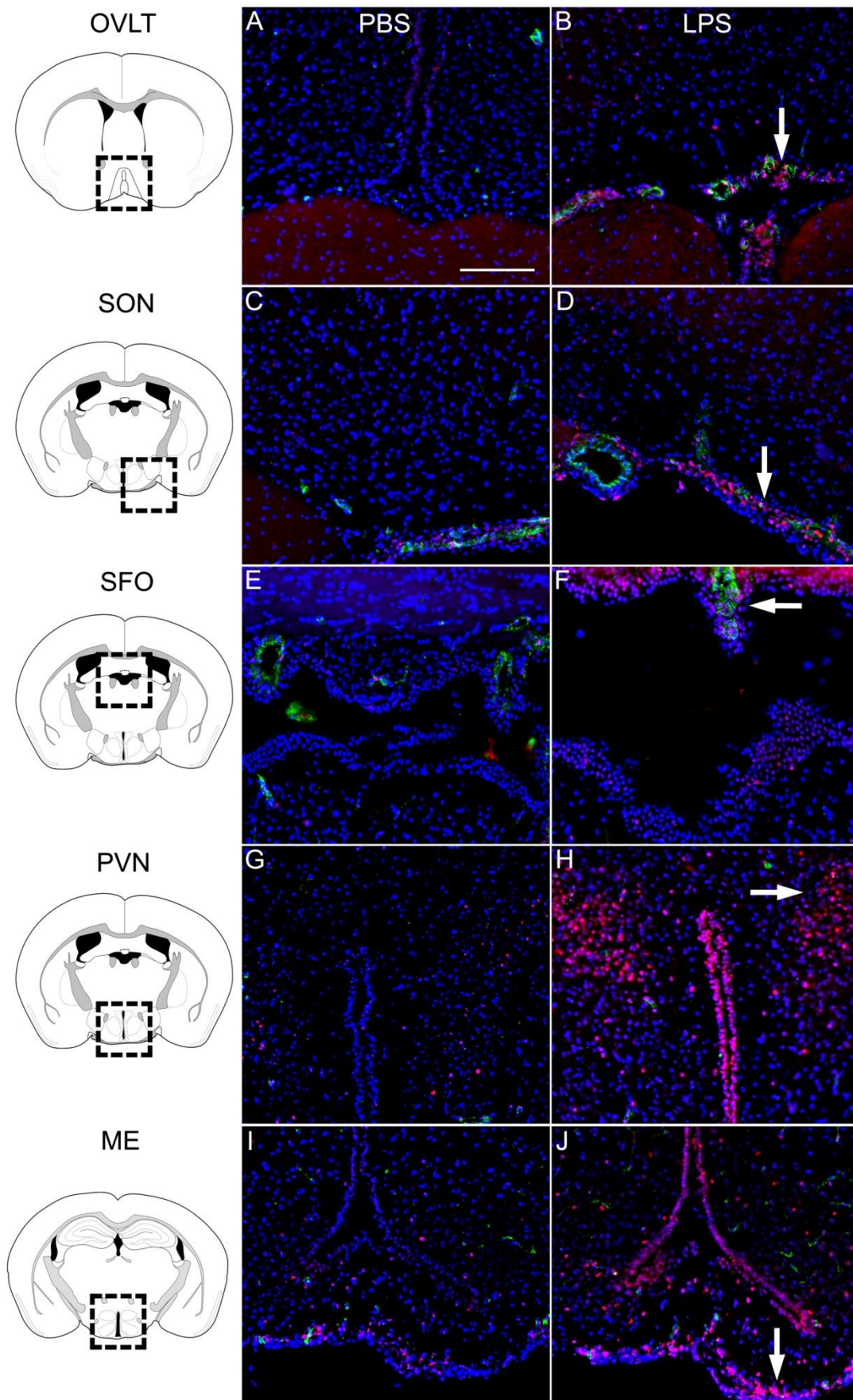


Abbildung 11-1

Qualitative Auswertung und Verteilung der NF-IL6-Signale in ausgewählten Bereichen des Hypothalamus der Maus (repräsentative Fotos).

In den sensorischen Cirkumventrikulären Organen (*Organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT), *Organum subfornicale* (SFO), *Eminentia mediana* (ME), dem *Nucleus paraventricularis* (PVN) und dem *Nucleus supraopticus* (SON) sind 8 h nach der i.p. Injektion von 100 µg/kg KGW LPS im Vergleich zur Kontrollinjektion mit PBS (linke Seite) die NF-IL6-immunreaktiven Zellen (Rot) eindeutig detektierbar (rechte Seite, Pfeile). Die Überlagerung mit dem Zellkernsignal (DAPI, Blau) ist durch die Pinkfärbung erkennbar. In Grün ist der Zellmarker für Endothelzellen (von Willebrand Faktor, vW) dargestellt. Zu beachten bleibt, dass die Abbildung A etwas caudal vom OVLT ist und in F caudale Anteile des SFO dokumentiert wurden.

Um die anatomische Lage der untersuchten Region zu verdeutlichen, ist auf der linken Seite der Bildtafel jeweils eine schematische Darstellung dieser gezeigt. Die schwarzen Kästchen weisen auf den in den Übersichtsaufnahmen gezeigten Ausschnitt hin.

Der Größenmarker entspricht 200 µm in allen Aufnahmen (A-J).

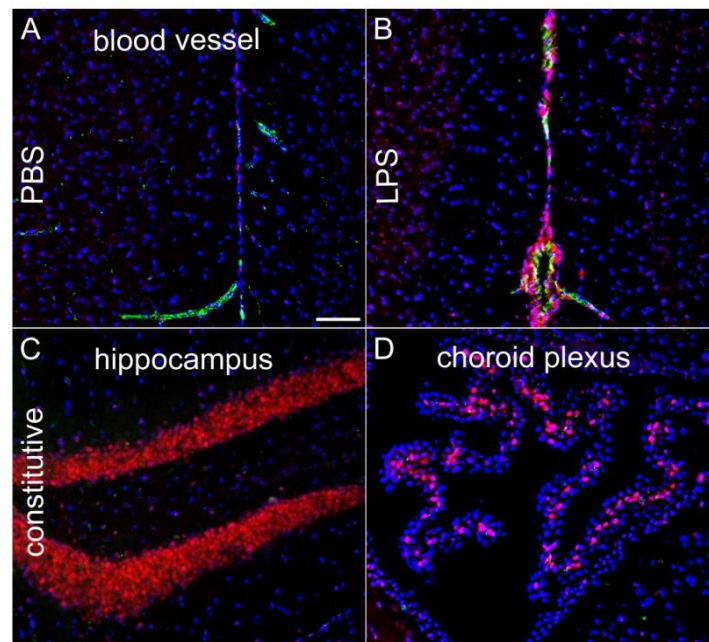


Abbildung 11-2

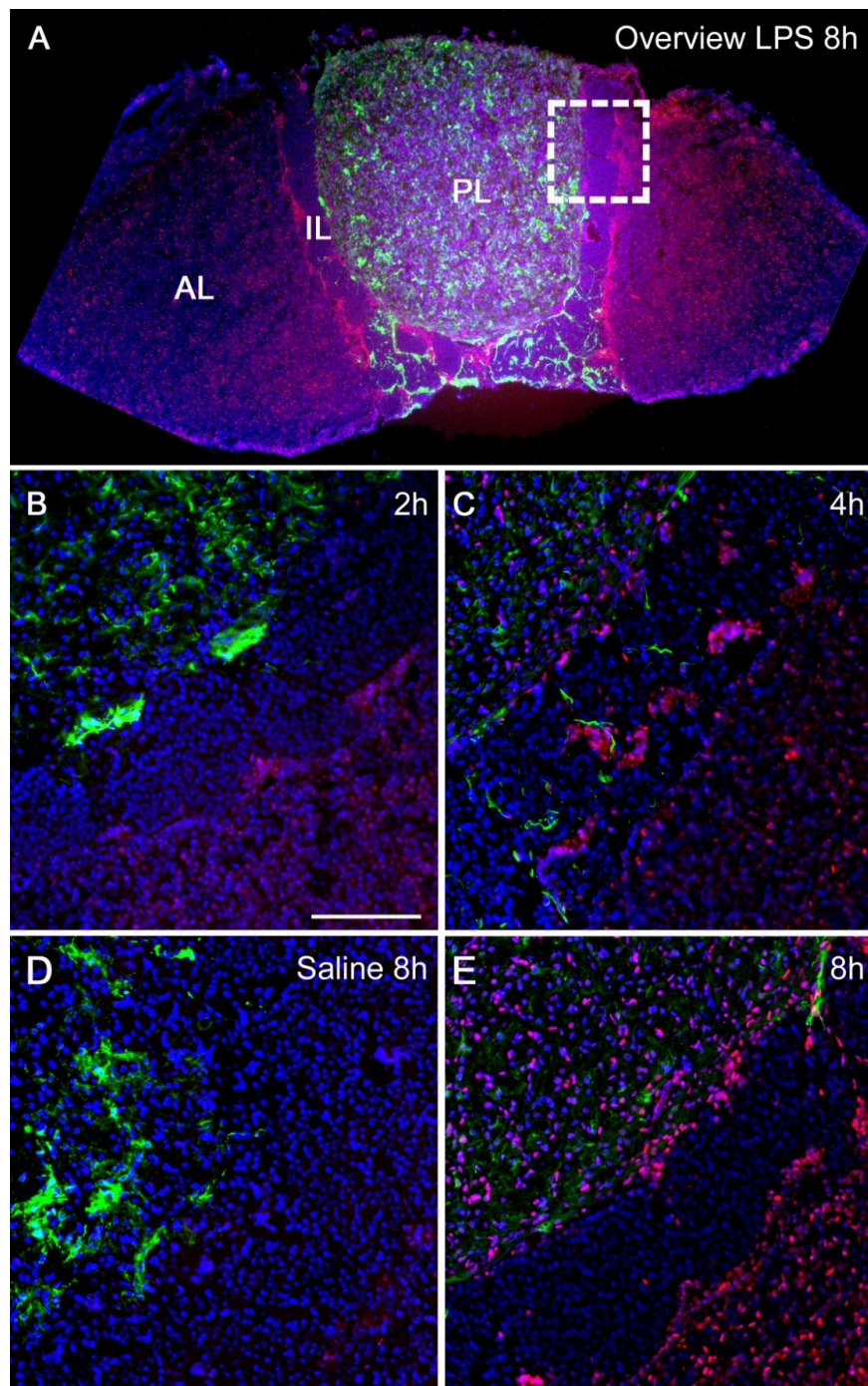
Verteilung der NF-IL6 Signale in größeren Gefäßen und Kapillaren nach der i.p. Injektion von 100 µg/kg KGW LPS (B) im Vergleich zur Kontrollinjektion mit PBS (A) und Darstellung der typischen konstitutiven Expression von NF-IL6 im Hippocampus (C) und im *Plexus choroideus* (D) (repräsentative Fotos). Die Überlagerung mit dem Zellkernsignal (DAPI, Blau) ist durch die Pinkfärbung erkennbar. In Grün ist der Zellmarker für Endothelzellen (von Willebrand Faktor, vW) dargestellt.

Der Größenmarker entspricht 100 µm in allen Aufnahmen (A-D).

12. Charakterisierung der Aktivierung entscheidender Transkriptionsfaktoren im Verlauf von LPS-induzierten Entzündungsreaktionen in der Hypophyse von Ratten

Um die potenzielle Rolle von NF-IL6 in der Aktivierung der HPA-Achse und die mögliche Interaktion von NF κ B und STAT3 mit NF-IL6 zu untersuchen, erfolgte eine zeitliche, räumliche und phänotypische Charakterisierung der NF-IL6-immunreaktiven Zellen.

12.1. Charakterisierung der NF-IL6-Immunreaktivität im zeitlichen Verlauf und in Abhängigkeit von der LPS Dosis



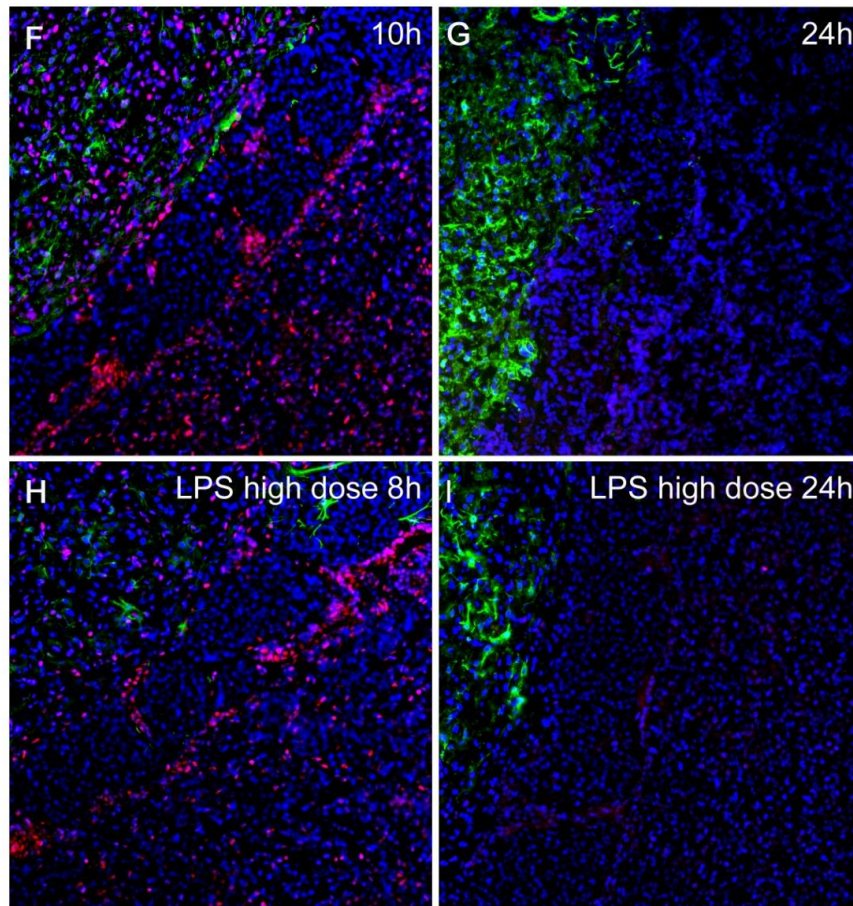


Abbildung 12-1

Verteilung der NF-IL6-immunreaktiven Zellen in der Hypophyse einer Ratte in der Übersicht (A) bzw. in Detailaufnahmen (B-I), in welchen die Aufteilung in Hinterlappen (PL), Zwischenlappen (IL) und Vorderlappen (AL) gut zu unterscheiden ist.

Des Weiteren werden die unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkte (2, 4, 8, 10 und 24 h) nach der Injektion von 100 µg/kg KGW LPS (B-G) bzw. 1 mg/kg KGW LPS (high dose; H und I) gezeigt im Vergleich zur Kontrolle mit physiologischer Kochsalzlösung (Saline, D).

Im blauen Kanal ist die Zellkernfärbung (DAPI), in Grün der Zellmarker für Pituizyten (GFAP) und in Rot die NF-IL6-immunreaktiven Zellen zu erkennen.

Es wurden 2-4 Schnitte pro Ratte und 3 Ratten pro Gruppe ausgewertet.

Der Größenmarker in B entspricht 100 µm und dieser gilt entsprechend in den Aufnahmen C-I.

In den 20 µm dicken Hypophysenschnitten der Ratten wurde die Verteilung der NF-IL6-Signale im Vorder-, Hinter-, und Zwischenlappen nach i.p. Injektion von 100 µg/kg bzw. 1 mg/kg KGW LPS untersucht. Die höchste Dichte an NF-IL6-immunreaktiven Zellen konnte (abhängig von den Untersuchungszeitpunkten) im Vorderlappen detektiert werden. Zwischen Hinterlappen und Vorderlappen der Hypophyse konnten jedoch oftmals nur geringe Unterschiede bezüglich der Dichte an Signalen identifiziert werden (Abbildung 12-1). Im Zwischenlappen konnte zu keinem der untersuchten Zeitpunkte eine NF-IL6-Aktivität festgestellt werden (Abbildung 12-1, B, C, E, F und H). Auffällig war allerdings der Bereich im Übergang von Vorderlappen zu Zwischenlappen, da dort eine besonders hohe Dichte an NF-IL6-immunreaktiven Zellen mit hoher Intensität zu verzeichnen war (Abbildung 12-1, B, C, E, F und H). Der Phänotyp dieser Zellgruppe konnte anhand der in dieser vorliegenden

Arbeit verwendeten Zellmarkerproteine nicht identifiziert werden. Es war des Weiteren eine deutliche Steigerung der Anzahl und Intensität der NF-IL6 Signale im Zeitverlauf bei Verwendung der niedrigeren LPS-Dosis (100 µg/kg KGW) zu erkennen, wobei 2 h *post injectionem* (p.i.) nur im Vorderlappen und 4 h p.i. auch im Hinterlappen immunreaktive Zellen detektiert werden konnten (Abbildung 12-1, B und C). Zum Zeitpunkt 8 h nach der LPS-Injektion konnte die maximale Dichte und Intensität der NF-IL6-immunreaktiven Zellen sowohl im Vorderlappen als auch im Hinterlappen detektiert werden (Abbildung 12-1, E). Eine kontinuierliche Abnahme fand ab dem Zeitpunkt 10 h bis 24 h p.i. statt bis immunhistochemisch nach 24 h nur noch wenige NF-IL6-Signale in den Zellkernen erkennbar waren (Abbildung 12-1, F und G). Nach Injektion der hohen Dosis von 1 mg/kg KGW LPS war zum Zeitpunkt 8 h p.i. bezüglich der NF-IL6-Immunreaktivität im Vergleich zur niedrigen Dosis von 100 µg/kg KGW LPS kein signifikanter Unterschied erkennbar. Zum Zeitpunkt 24 h p.i. waren nach der hohen LPS-Dosis geringfügig mehr NF-IL6-Signale vorhanden als bei der Verwendung der niedrigeren LPS-Dosis und diese Signale befanden sich vorwiegend im Übergang von Vorderlappen zu Zwischenlappen der Hypophyse (Abbildung 12-1, H und I).

semiquantitative analysis of nuclear NF-IL6 immunoreactivity			
anterior lobe of the pituitary			
time [h]	100 µg/kg LPS	1 mg/kg LPS	control (saline)
2	+ (3,0)		
4	++ (4,4)		
8	+++ (5,0)	+++ (4,6)	± (2,0)
10	++ (4,4)		
24	± (2,0)	± (2,4)	
posterior lobe of the pituitary			
time [h]	100 µg/kg LPS	1 mg/kg LPS	control (saline)
2	± (2,0)		
4	++ (4,1)		
8	+++ (4,8)	++ (3,9)	± (2,0)
10	++ (4,2)		
24	± (2,0)	± (2,2)	

Tabelle 12-1

Semiquantitative Analyse der Anzahl nukleärer NF-IL6-Signale im Vorderlappen und im Hinterlappen der Hypophyse der Ratte 2, 4, 8, 10 und 24 h nach der Injektion von 100 µg/kg KGW LPS bzw. 8 und 24 h nach der Injektion von 1 mg/kg KGW LPS im Vergleich zur Kontrolle (8 h nach Injektion von Saline). Eine Bewertung der relativen Dichte an Signalen wurde anhand eines Fünfpunkteschemas (siehe Kapitel 9.1.4) vollzogen und für jede Tiergruppe gemittelt: +++ (5) = hohe Dichte, ++ (4) = mittlere bis moderate Dichte, + (3) = niedrige Dichte, ± (2) = einzelne Signale in einigen Fällen, - (1) = keine Signale.

Es wurden 2-4 Schnitte pro Ratte und 3 Ratten pro Gruppe ausgewertet.

2 h p.i. konnten nach Injektion der niedrigen Dosis nur im Vorderlappen und erst 4 h p.i. auch im Hinterlappen immunreaktive Zellen detektiert werden. Es war eine deutliche Steigerung der

Anzahl und Intensität der NF-IL6-Signale im Zeitverlauf zu erkennen. 8 h p.i. war die höchste Dichte und Intensität der Signale sowohl im Vorder- als auch im Hinterlappen zu verzeichnen, welche sich 10 h p.i. stetig reduzierte, um dann nach 24 h p.i. auf ein basales Niveau zu sinken. Die hohe LPS-Dosis (1 mg/kg KGW LPS) verursachte im Vergleich zur niedrigen Dosis zum Zeitpunkt 8 h p.i. eine ähnlich hohe Anzahl und Intensität an NF-IL6-Signalen, welche 24 h p.i. sowohl im Vorder- als auch im Hinterlappen noch stärker war als bei der Verwendung der niedrigen Dosis.

12.2. NFκB- und STAT3-Aktivität sowie die Interaktion mit NF-IL6

Da neben NF-IL6 die Transkriptionsfaktoren NFκB und STAT 3 im Rahmen eines entzündlichen Geschehens im Körper und bei der Entstehung von zentralnervös kontrollierten Krankheitssymptomen eine entscheidende Rolle spielen (siehe Kapitel 5.1 und 5.2), sollte ihre Bedeutung, Funktion und Zusammenarbeit im Bereich der HPA-Achse näher untersucht werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein besonderes Augenmerk auf die Hypophyse gelegt.

In der immunhistochemischen Untersuchung der 20 µm dicken Hypophysenschnitte zeigte sich zum Zeitpunkt 8 h p.i. von 100 µg/kg KGW LPS im Vergleich zur Kontrolle eine deutliche NF-IL6-Aktivierung (Abbildung 12-2, a1 und b1). Die Anzahl und Intensität der Signale (in Rot) war im Vorderlappen am stärksten. Im Hinterlappen zeigten sich deutlich weniger NF-IL6-immunreaktive Zellen, wobei im Vergleich zur Kontrolle mit konstitutiver NF-IL6-Expression eine Steigerung der Anzahl und eine höhere Intensität der Signale deutlich erkennbar waren. Im Zwischenlappen hingegen waren keine immunreaktiven Zellen detektierbar (Abbildung 12-2, B). Die Transkriptionsfaktoren STAT3 und NFκB (in Grün) waren sowohl im Vorder- als auch im Hinterlappen der Hypophyse detektierbar und 8 h nach LPS-Injektion zum einen als singuläres Signal zu erkennen, zum anderen aber auch in Colokalisation mit NF-IL6 (die Überlagerung der Signale aus Rot und Grün wird durch eine Gelbfärbung sichtbar, siehe offener Pfeil, Abbildung 12-2, a1-3 und b1-3). Das bedeutet, dass im HVL 8 h nach einer Stimulation mit LPS die proinflammatorischen Transkriptionsfaktoren sowohl einzeln im Zellkern aktiviert wurden, aber auch teilweise in den gleichen Zellen und damit potenziell im sogenannten „cross talk“ interagierten. Ebenfalls auffällig war die Tatsache, dass sowohl NFκB- als auch STAT3-Signale vorwiegend im Übergang von Vorder- bzw. Hinterlappen zu Zwischenlappen der Hypophyse detektierbar waren.

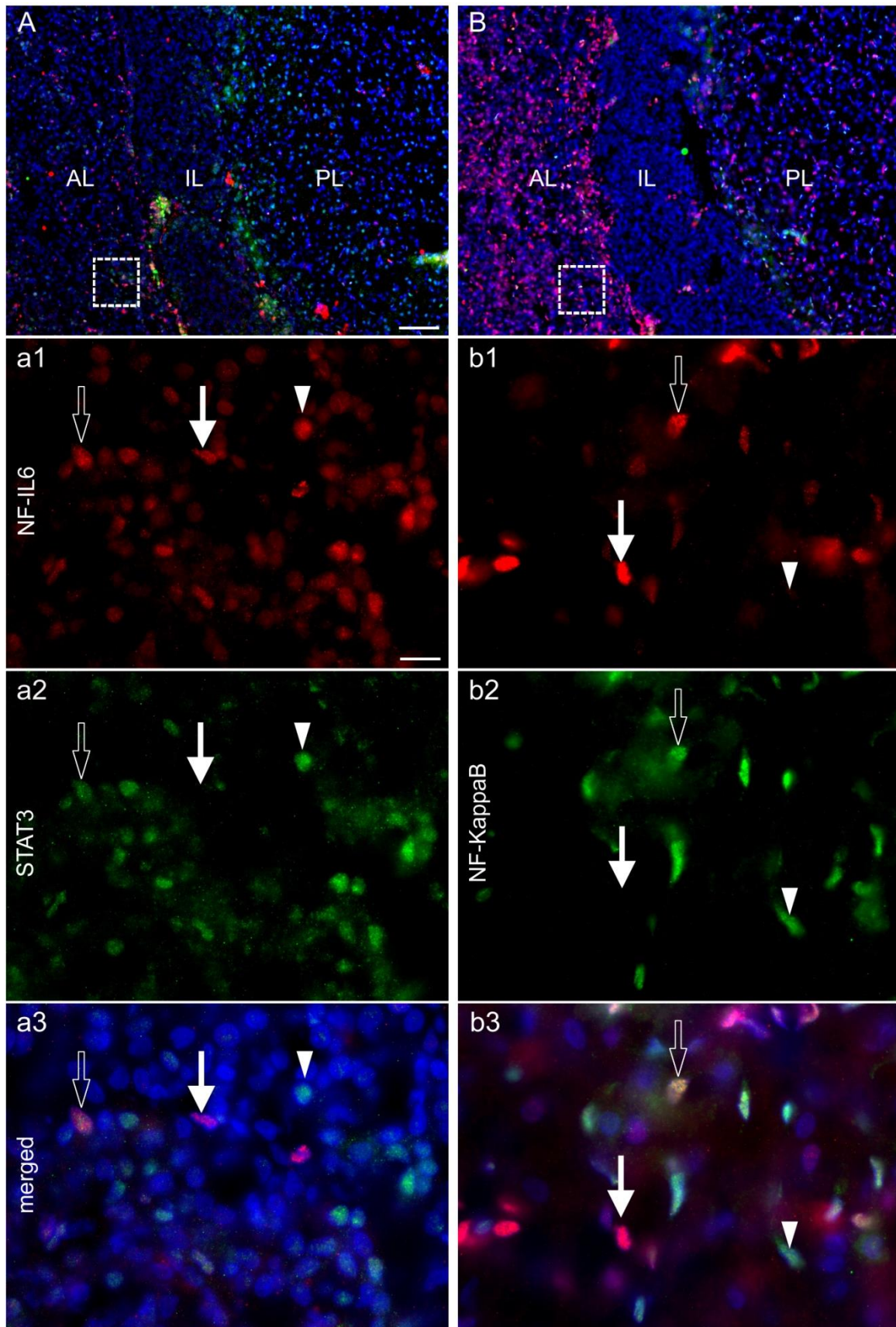


Abbildung 12-2

Interaktion zwischen den Transkriptionsfaktoren NF-IL6, STAT3 und NFκB in der Hypophyse (Vorderlappen) einer Ratte 8 h nach i.p. Stimulation mit 100 µg/kg KGW LPS (a1-3 und b1-3) im Vergleich zu einem Saline-injizierten Kontrolltier (A) (repräsentative Fotos).

In der Übersicht (gekennzeichnet mit Großbuchstaben) sind alle drei Anteile [Vorderlappen (AL), Zwischenlappen (IL), Hinterlappen (PL)] und in den Detailaufnahmen (gekennzeichnet mit Kleinbuchstaben) ist nur der Vorderlappen zu sehen. Die weißen Kästchen weisen auf den gewählten Bildausschnitt hin.

In allen Aufnahmen sind die Zellkerne im blauen Kanal dargestellt (DAPI-Kernfärbung).

Die NF-IL6-Signale werden in Rot (a1 und b1), die STAT3-, und NFκB-Signale in Grün dargestellt (a2 bzw. b2). Colokalisationen erkennt man aufgrund der Überlagerung von roten und grünen Signalen an der Gelbfärbung (a3 und b3).

In a3 und b3 („merged“) wird die Colokalisation der genannten Transkriptionsfaktoren nach LPS-Stimulation dargestellt, wobei der gefüllte Pfeil die singulären NF-IL6-Signale, der offene Pfeil die Colokalisation von NF-IL6 und NFκB bzw. STAT3 und die gefüllte Pfeilspitze die singulären NFκB- bzw. STAT3-Signale markiert. Nach LPS-Injektion ist in a3 und b3 eine deutliche Colokalisation zwischen NF-IL6 und STAT3 bzw. NFκB sichtbar (offener Pfeil), wobei die Transkriptionsfaktoren auch als singuläres Signal detektiert werden können (geschlossener Pfeil: NF-IL6; Pfeilspitze: NFκB bzw. STAT3).

Der Größenmarker in A entspricht 100 µm und gilt auch für B. Der Größenmarker in a1 entspricht 10 µm und dieser gilt entsprechend in den Aufnahmen a2 bis a3 und b1 bis b3.

12.3. Identifizierung der verschiedenen NF-IL6-immunreaktiven Zellphänotypen

Die NF-IL6-immunreaktiven Zellen in der Hypophyse der Ratte wurden während der immunhistochemischen Untersuchungen mit unterschiedlichen Zellmarkerproteinen colokalisiert. Dies wurde genutzt, um die reaktiven Zellen den entsprechenden Zellphänotypenpopulationen zuordnen zu können und neue Erkenntnisse über die Bedeutung und Funktion von NF-IL6 in der HPA-Achse von Ratten zu erlangen. Diese Analysen wurden wie die vorherigen Untersuchungen an 20 µm dicken Schnitten der Hypophyse von Ratten durchgeführt, welche mit einer Dosis von 100 µg/kg KGW LPS bzw. mit physiologischer Kochsalzlösung als Kontrolle stimuliert und 8 h p.i. getötet wurden. Es konnte 8 h nach LPS-Injektion eine Colokalisation von NF-IL6 mit corticotropen Zellen (Zellmarker: adrenocorticotropes Hormon, ACTH), Endothelzellen (Zellmarker: von Willebrand Faktor, vW), astrozytenartigen Pituizyten (Zellmarker: glial fibrillary acidic protein, GFAP), mikrogliartigen Zellen und perivaskulären Makrophagen (Zellmarker: CD68 und CD163) sowie nNOS-positiven Zellen (Zellmarker: neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase, nNOS) identifiziert werden.

In Abbildung 12-3 A und B wird sichtbar, dass in den Zellkernen der corticotropen Zellen (ACTH) des Hypophysenvorderlappens deutliche NF-IL6 Signale (durch die Überlagerung von roten und grünen Signalen in orange bis gelber Färbung) detektiert werden konnten (Abbildung 12-3, Bc), daneben waren allerdings auch nicht ACTH-positive Zellen NF-IL6-reaktiv (Rot). Im Hinterlappen waren erwartungsgemäß keinerlei ACTH-produzierende Zellen vorhanden und nur einzelne NF-IL6-immunreaktive Zellen sichtbar (Abbildung 12-3, Ba). Im Zwischenlappen konnten unabhängig von der Behandlung zu keinem Zeitpunkt NF-

IL6-immunreaktive Zellen identifiziert werden. Aufgrund der im Zwischenlappen stattfindenden POMC-Spaltung in verschiedene Peptidhormone (siehe Kapitel 4.2) war dieser allerdings stark positiv für den gewählten Proteinzellmarker ACTH (Abbildung 12-3, Bb).

In den Zellkernen von Endothelzellen (vWF) des gesamten Hypophysengewebes konnten im Vergleich zum Kontrolltier (Abbildung 12-3, C) nach LPS-Stimulation (Abbildung 12-3, D) Colokalisationen mit NF-IL6 detektiert werden. Das heißt, dass im Vorder-, Zwischen-, und Hinterlappen rote NF-IL6-Signale in Endothelzellen sichtbar waren (Abbildung 12-3, Da-c). Auch die Zellkerne von perivaskulären Makrophagen (CD163) enthielten im Vorderlappen und im Hinterlappen sowohl in der Kontrolle als auch nach LPS-Stimulation ein positives NF-IL6-Signal in Rot. Nach Stimulation mit LPS war erneut eine besonders hohe Dichte an immunreaktiven Zellen im Bereich des Übergangs von Vorderlappen zu Zwischenlappen und Hinterlappen zu Zwischenlappen (Abbildung 12-3, Fa, b, c) im Vergleich zur Hypophyse der Kontrolltiere (Abbildung 12-3, Ea, b, c) auffällig.

Ausschließlich im Hinterlappen konnten GFAP-positive Zellen (Abbildung 12-4, A und B) und nNos-positive Neuronenausläufer (Abbildung 12-4, C und D) detektiert werden, welche nach Stimulation des Tieres eine eindeutige NF-IL6-Immunreaktivität zeigten (Abbildung 12-4, Ba, b, c und Da, b, c). Aktivierte CD68-positive Zellen waren im Kontrolltier und im stimulierten Tier positiv für NF-IL6 und sowohl in Hinter-, als auch im Vorderlappen detektierbar (Abbildung 12-4, E und F).

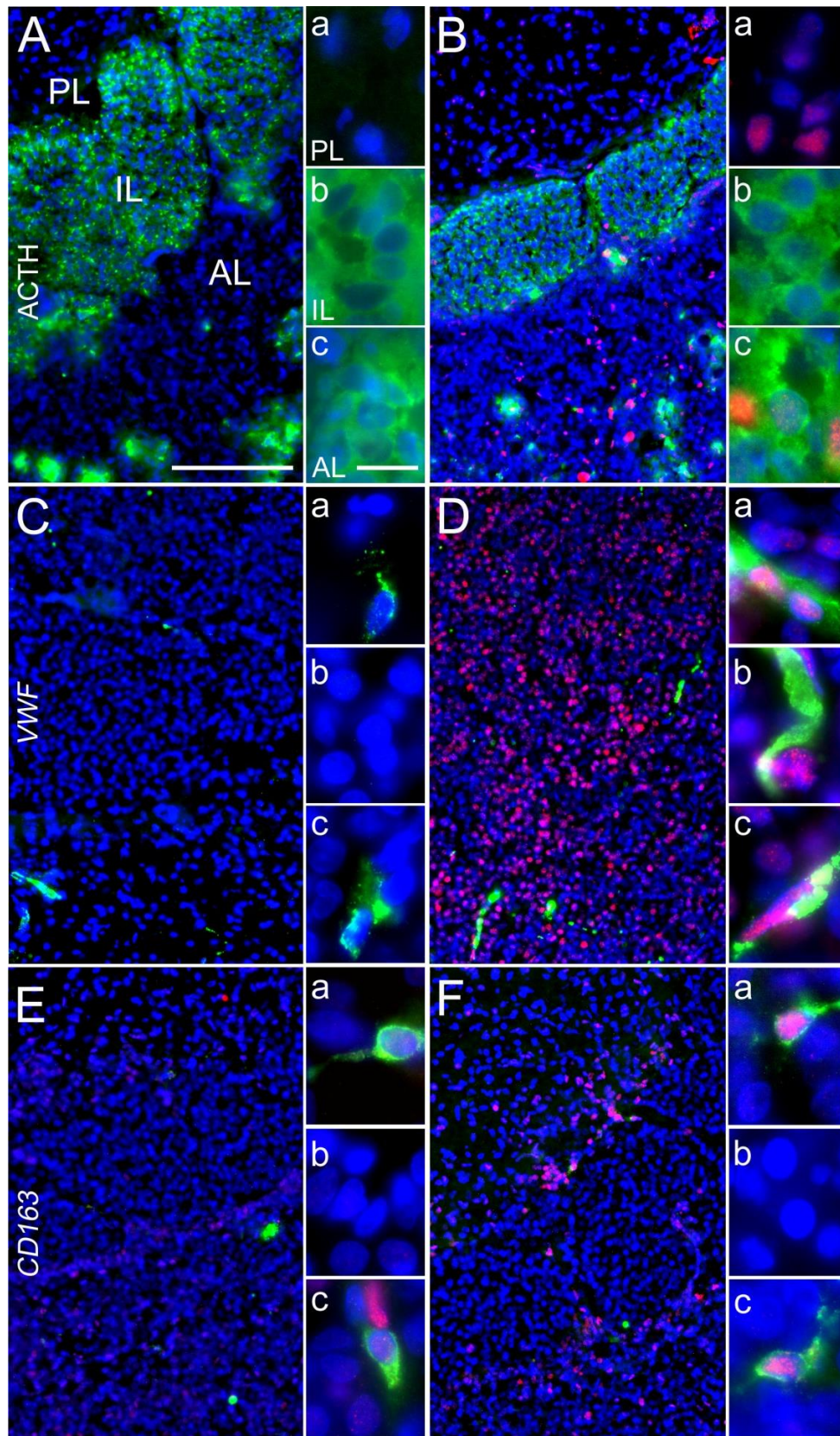


Abbildung 12-3

Repräsentative Fotos NF-IL6 exprimierender Zellphänotypen in der Hypophyse von nicht stimulierten (physiologische Kochsalzlösung) und mit 100 µg pro kg KGW LPS stimulierten Ratten zum Zeitpunkt 8 h p.i..

In der Übersicht (gekennzeichnet mit Großbuchstaben) sind alle drei Anteile [Vorderlappen (AL), Zwischenlappen (IL), Hinterlappen (PL)] und in den Detailaufnahmen (gekennzeichnet mit Kleinbuchstaben) ist ein Ausschnitt aus dem jeweiligen Anteil zu sehen.

Der Größenmarker entspricht in A-F 100 µm und in allen Detailaufnahmen a-c 10 µm.

Eine Colokalisation der jeweiligen Zelltypen mit NF-IL6 (in Rot) konnte in corticotropen Zellen (Zellmarker: Adrenocorticotropes Hormon, ACTH), Endothelzellen (Zellmarker: von Willebrand Faktor, vW) und perivaskulären Makrophagen (Zellmarker: „cluster of differentiation“, CD163) identifiziert werden.

In allen Aufnahmen sind die Zellkerne im blauen Kanal dargestellt (DAPI-Kernfärbung).

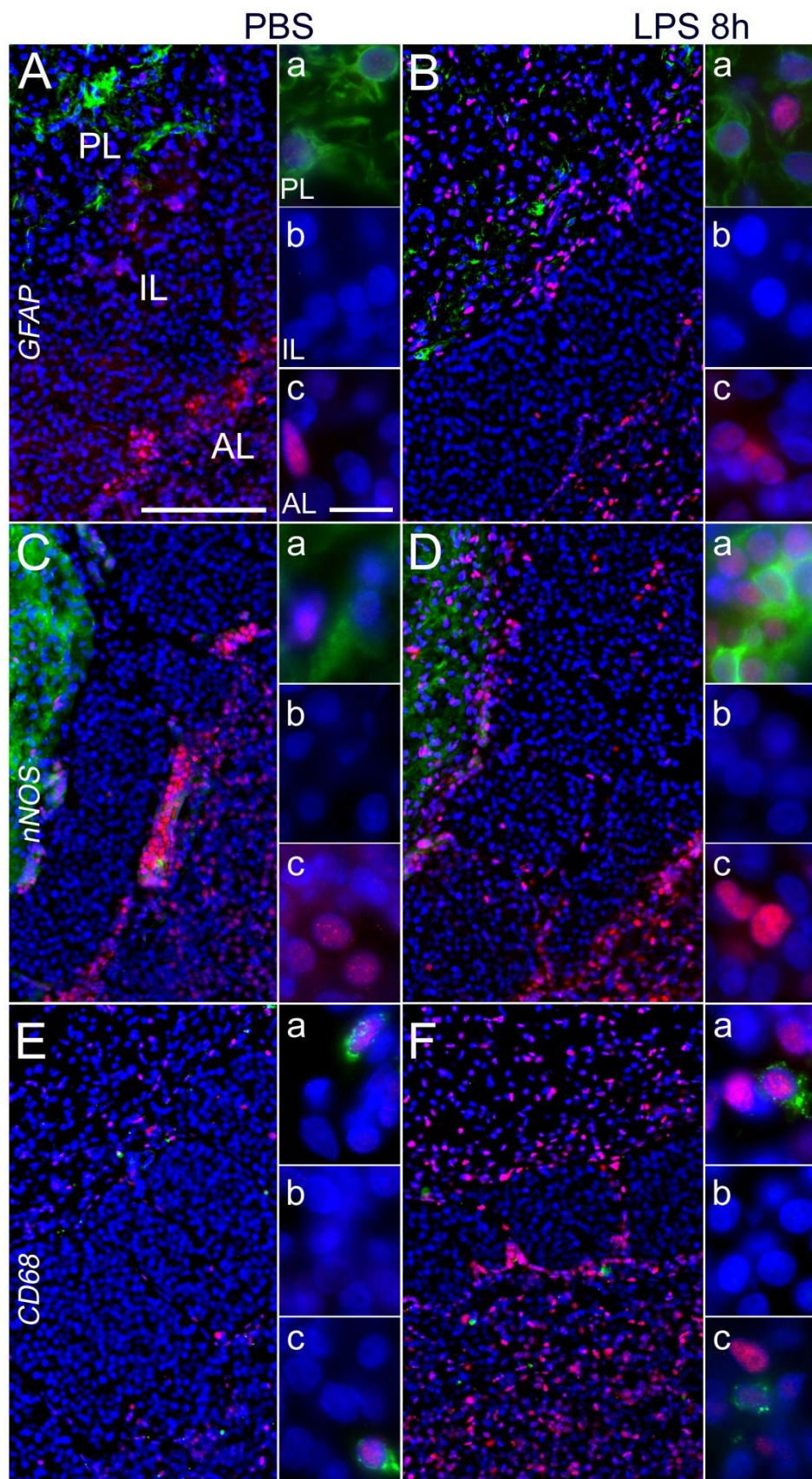


Abbildung 12-4

Repräsentative Fotos NF-IL6 exprimierender Zellphänotypen in der Hypophyse nicht stimulierter (physiologische Kochsalzlösung) und mit 100 µg pro kg KGW LPS stimulierter Ratten zum Zeitpunkt 8 h p.i..

In der Übersicht (gekennzeichnet mit Großbuchstaben) sind alle drei Anteile [Vorderlappen (AL), Zwischenlappen (IL), Hinterlappen (PL)] und in den Detailaufnahmen (gekennzeichnet mit Kleinbuchstaben) ist ein Ausschnitt aus dem jeweiligen Anteil zu sehen. Der Größenmarker entspricht in A-F 100 µm und in allen Detailaufnahmen a-c 10 µm.

Eine Colokalisation der jeweiligen Zelltypen mit NF-IL6 (in Rot) konnte des Weiteren in Pituizyten (Zellmarker: glial fibrillary acidic protein, GFAP), CD68-positiven Zellen (Zellmarker: „cluster of differentiation“ 68, CD68) und nNOS-positiven Zellen (Zellmarker: neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase, nNOS) identifiziert werden.

In allen Aufnahmen sind die Zellkerne im blauen Kanal dargestellt (DAPI-Kernfärbung).

13. Charakterisierung der NF-IL6-Reaktivität im Hypothalamus und in der Hypophyse von Ratten nach Open Field Stress

13.1. Physiologische Parameter und Plasmazytokine nach Open Field Stress

13.1.1. Verhalten, lokomotorische Aktivität und Körperkerntemperatur

Nach dem Umsetzen der Ratten aus ihrem gewohnten Käfig in das sogenannte „open field“ (siehe Kapitel 8.7.2), begannen sie sofort mit der Erkundung des neuen Umfeldes. Dies äußerte sich in einer erhöhten motorischen Aktivität und dem Beschnupern des Bodens und der Wände. Des Weiteren urinieren die Tiere vermehrt und setzten Kot ab. Zu den Zeitpunkten 30 bis 240 Minuten nach Beginn des Open Field Stress Versuches, wurden gegenüber den Kontrolltieren signifikant erhöhte kumulative Gesamtanzahlen an sog. „counts“ alle 5 Minuten durch das telemetrische System registriert (Abbildung 13-2). Das gemittelte Aktivitätsmuster (je über 15 Minuten gemittelte Gesamtaktivität) der gestressten Ratten bzw. ihrer Kontrolltiere im zeitlichen Verlauf über die gesamte Versuchsdauer von 4 h zeigte deutlich die signifikante Erhöhung der Aktivität (* $P < 0,05$) zu den Zeitpunkten 30 bis 90 Minuten (Abbildung 13-2).

Die Körperkerntemperatur der gestressten Ratten stieg im Verlauf des Versuches um im Mittel $\sim 1,03 \pm 0,19$ °C an (Abbildung 13-1, A) und war über dem Zeitraum von 30 bis 120 Minuten signifikant zu den Kontrolltieren erhöht. Nachdem die Tiere die Umgebung ausreichend erkundet hatten, zogen sie sich in eine Ecke des Käfigs zurück und bewegten sich bis zum Versuchsende nur noch wenig. Die Kontrolltiere verblieben wie gewohnt in ihrem Käfig mit Einstreu, Futter und Wasser *ad libitum* und verschliefen meist den Versuchsablauf.

13.1.2. Konzentration bioaktiver proinflammatorischer Zytokine im Blutplasma

Die Plasmaproben der Tiere wurden 30, 60, 90, 120 oder 240 Minuten nach Beginn des Open Field Stress bzw. in der Vergleichsgruppe nach 60 oder 240 Minuten unter tiefer Narkose vor der Perfusion bzw. der Tötung entnommen. Mit Hilfe des Bioassays wurde die Menge an bioaktivem TNF- α bzw. IL-6 bestimmt (siehe Kapitel 9.2)

13.1.2.1. TNF- α (Tumornekrosefaktor- α)

In dem untersuchten Versuchszeitraum von bis zu 240 Minuten konnte weder bei den gestressten Ratten noch in der gemessenen Kontrollgruppe das Zytokin TNF- α im Blutplasma detektiert werden.

13.1.2.2. IL-6 (Interleukin-6)

Eine basale Konzentration (~ 300 I.U./ml) des Zytokins IL-6 konnte im Plasma der nicht gestressten Kontrolltiere zum Zeitpunkt 60 und 240 Minuten ermittelt werden (Abbildung 13-1, B). Die im Open Field gestressten Tiere zeigten im Vergleich tendenziell eine Erhöhung der IL-6-Konzentration zu allen Zeitpunkten, wobei zum Zeitpunkt 60 Minuten nach Beginn des Versuches ein signifikanter Unterschied ($*P < 0,05$) zu den IL-6-Konzentrationen der nicht gestressten Tiere zu verzeichnen war (Abbildung 13-1, C).

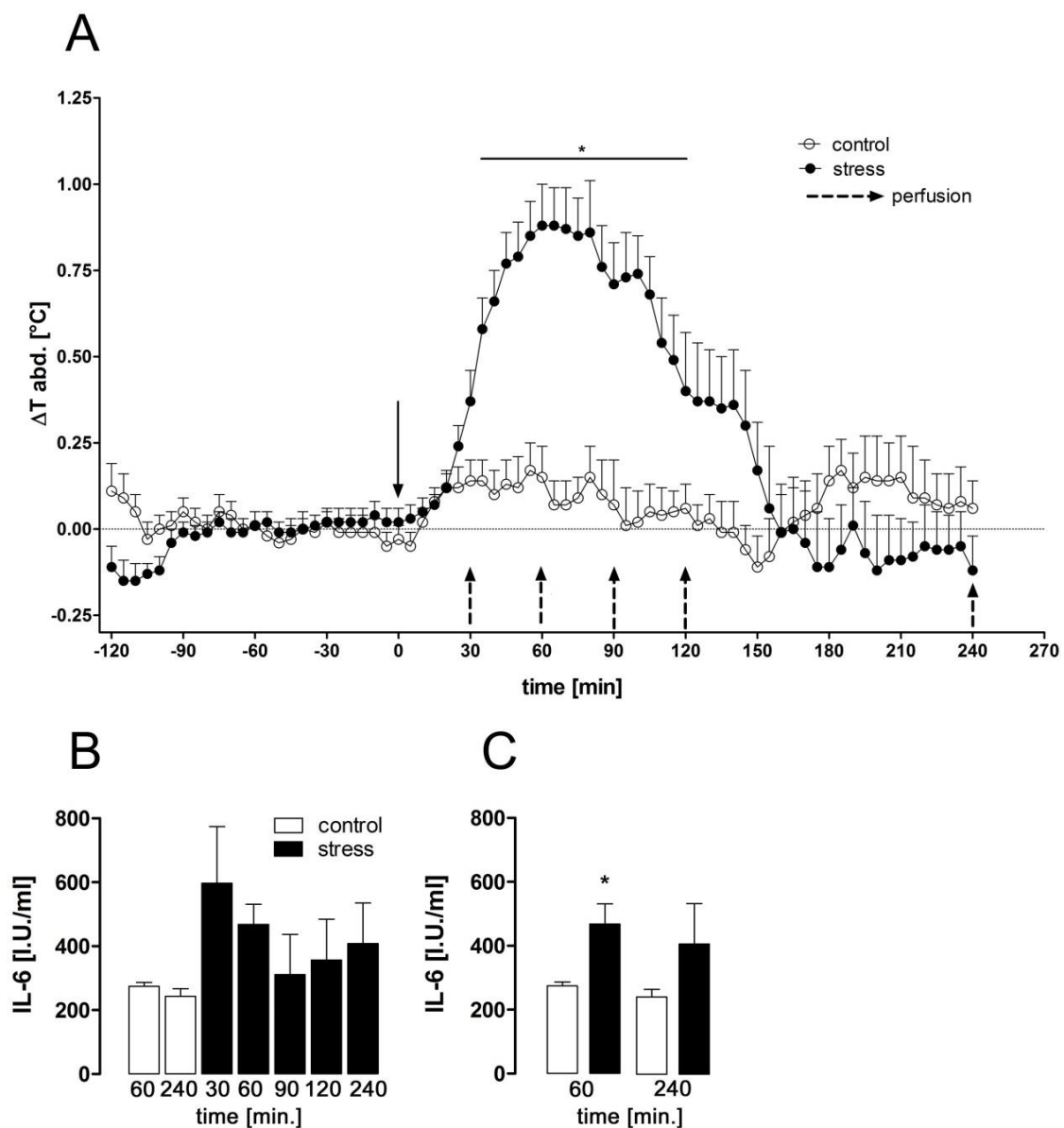


Abbildung 13-1

Entwicklung der Körperkerntemperatur und der Plasmazytokine nach Open Field Stress über einen Zeitraum von 240 Minuten.

Der Anstieg der Körperkerntemperatur der im Open Field gestressten Tiere betrug im Durchschnitt 1,03 °C und erreichte zu den Zeitpunkten 60 und 90 Minuten sein Maximum, um dann nach 120 Minuten auf Werte der Kontrolltiere zurückzugehen. Dies spiegelte sich auch in den im Plasma der Versuchstiere gemessenen IL-6-Konzentration wider, die bei den gestressten Ratten (schwarze Balken) zum Zeitpunkt 60 Minuten im Vergleich zu den Plasmaproben der Kontrolltiere signifikant erhöht war (C, * $P < 0,05$, weiße Balken); Kontrolltiere und stimulierte Tiere zum Zeitpunkt 60 und 240 Minuten je $n = 6$; $n = 3$ zu den anderen Zeitpunkten (B-C).

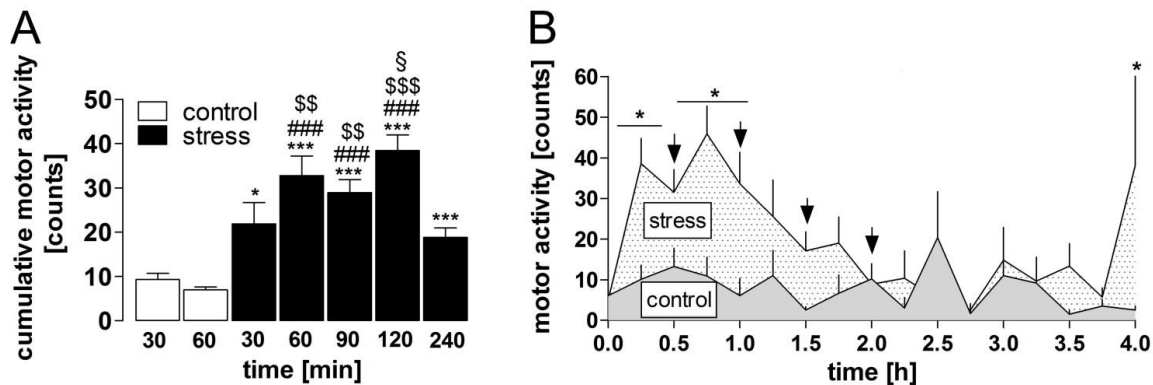


Abbildung 13-2

(A) Kumulative Aktivität der einzelnen Versuchstiergruppen 30, 60, 90, 120 und 240 Minuten nach Beginn des Open Field Stress bzw. Aktivität der beiden Kontrollgruppen und stimulierten Gruppen nach 60- und 240 Minuten, jeweils $n = 6$; $n = 3$ zu den anderen Zeitpunkten.

* Vergleich zur Kontrollgruppe (240 Minuten): *** $P < 0,001$ und * $P < 0,05$;

Vergleich zur Kontrollgruppe (60 Minuten): ### $P < 0,001$

(B) Aktivitätsmuster (je über 15 Minuten gemittelte Gesamtaktivität) der gestressten Ratten bzw. der Kontrolltiere über die gesamte Versuchsdauer von 4 Stunden. Innerhalb der ersten 90 Minuten ist ein signifikanter Unterschied (* $P < 0,05$) zwischen Stress- und Kontrollgruppe erkennbar. Die schwarzen Pfeile markieren die Zeitpunkte an denen sich die Anzahl (n) der Tiere ändert, die für die Versuche und die Auswertung der Aktivität verwendet wurden.

13.1.3. Open Field Stress bei NF-IL6-Wildtyp- bzw. NF-IL6-Knock-out-Mäusen

Auch bei den Wildtyp- bzw. den NF-IL6-Knock-out-Mäusen wurde ein Open Field Stress Versuch analog zu den Ratten durchgeführt. Als Vergleich wurde die Baseline der Körperkerntemperatur über 24 h herangezogen, da die Tiere in diesem Zeitraum weder gestört noch einer Behandlung unterzogen wurden. Bezüglich der Baseline ließen sich signifikanten Unterschiede (* $P < 0,01$) zwischen den Genotypen Wildtyp-Maus (WT) und NF-IL6-Knock-out-Maus (KO) feststellen (Abbildung 13-4). Die Körperkerntemperatur der Knock-out-Mäuse zeigte zu Beginn der Aufzeichnung signifikant niedrigere Werte als die der Wildtypen. Nach weniger als 2 h (Zeitpunkt $t = 0$ h) hatten sich die Temperaturen beider Genotypen aneinander angeglichen. Erst in der Dunkelpphase und somit in der aktiven Phase der Tiere überstieg die Körperkerntemperatur der Wildtyp-Mäuse erneut die der Knock-out-Mäuse, um sich dann wieder langsam anzugleichen. Vergleich man die Körperkerntemperaturen der Wildtyp- mit den Knock-out-Mäusen nach Open Field Stress, fiel auf, dass die Knock-out-Tiere bis zur Beendigung des Versuches eine signifikant niedrigere Körperkerntemperatur

hatten als die Wildtyp-Mäuse. Signifikanz erreichte dieser Unterschied außer zu den Zeitpunkten 120 und 165 Minuten über den Zeitraum ab ~105 Minuten bis zum Ende des Versuchszeitraumes (240 Minuten, ** $P < 0,01$) (Abbildung 13-4, B). Innerhalb des eigenen Genotyps konnte deutlich die Erhöhung der Körperkerntemperatur nach Open Field Stress im Vergleich zur Baseline gezeigt werden (Abbildung 13-4, C und D). Die Unterschiede waren bei den Wildtyp-Mäusen über einen Zeitraum von 120 Minuten deutlicher bzw. länger als bei den Knock-out-Tieren (** $P < 0,001$) (Abbildung 13-4, C). Zum Zeitpunkt 160 Minuten nach Beginn des Open Field Stress sank die Körperkerntemperatur unter die Werte der Baseline ab. Bei den Knock-out-Mäusen sank nach 90 Minuten die Körperkerntemperatur nach einer kurzen (30 Minuten), signifikanten (** $P < 0,01$) Erhöhung durch den psychologischen Stressstimulus (von 15 bis 45 Minuten) unter die Werte der Baseline ab, um nach 210 Minuten den tiefsten Wert ($< 35,5^{\circ}\text{C}$) zu erreichen (** $P < 0,001$).

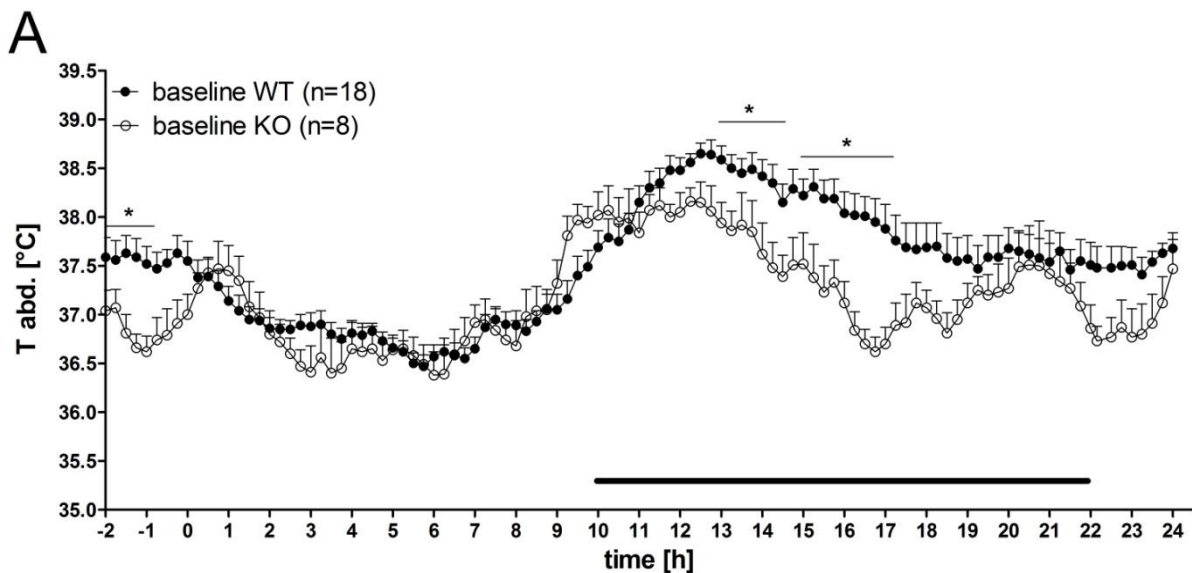


Abbildung 13-3

(A) Baseline der Körperkerntemperatur der beiden Genotypen „Wildtyp-Maus (WT)“ und „NF-IL6-Knock-out-Maus (KO)“ über 24 h ohne Behandlung oder Stress.

* $P < 0,05$: Vergleich zwischen den beiden Genotypen „WT“ und „KO“

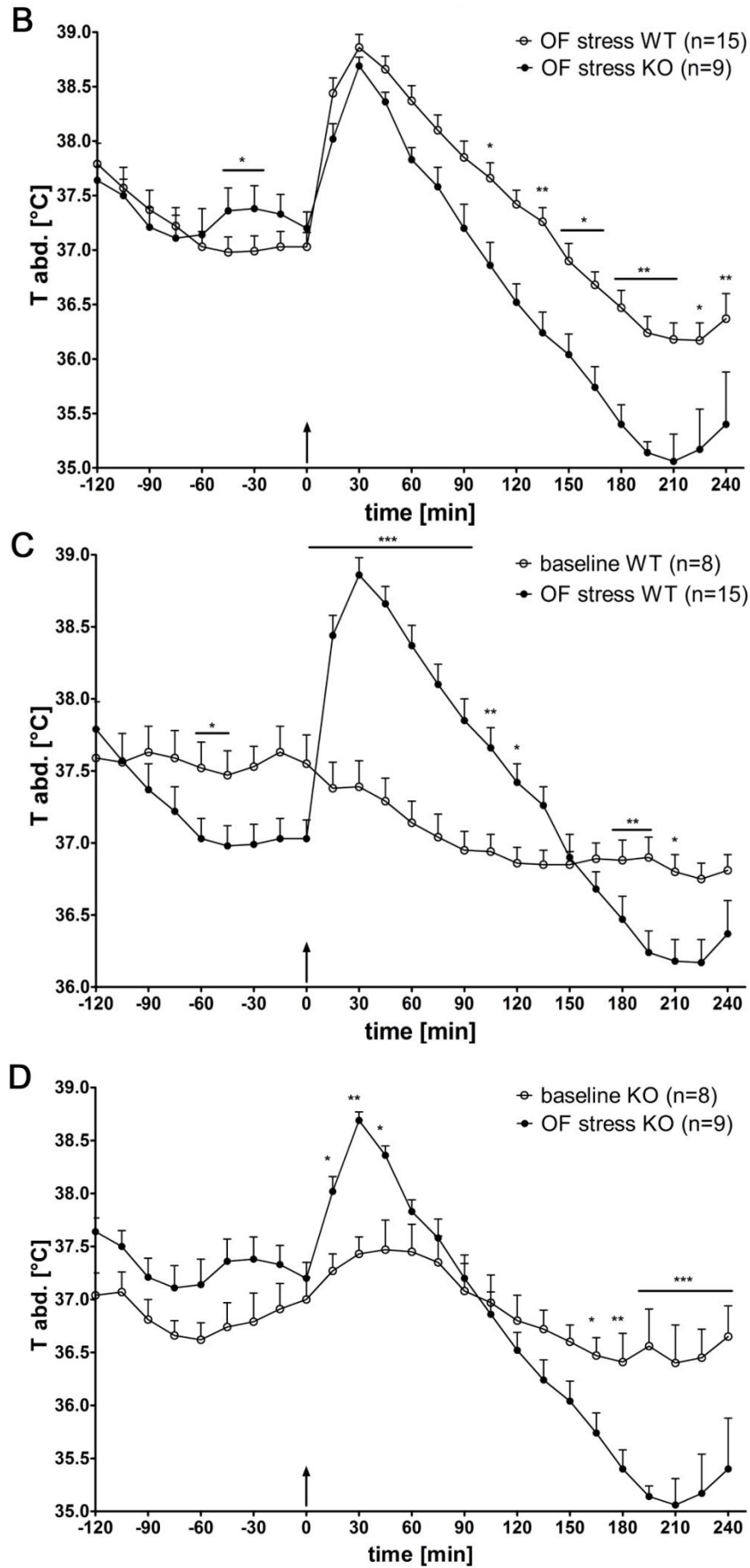


Abbildung 13-4

(B) Entwicklung der Körperkerntemperatur nach Open Field Stress innerhalb der Genotypen „Wildtyp-Maus (WT)“ und „NF-IL6-Knock-out-Maus (KO)“ über einen Zeitraum von 240 Minuten.

*** $P < 0,05$, ** $P < 0,01$: Vergleich zwischen den beiden Genotypen „WT“ und „KO“**

(C) Entwicklung der Körperkerntemperatur nach Open Field Stress über 240 Minuten im Vergleich zur Baseline innerhalb des Genotyps „WT“.

*** $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ und *** $P < 0,001$: Vergleich zwischen der Baseline und der Körperkerntemperatur nach Open Field Stress innerhalb des Genotyps „WT“**

(D) Entwicklung der Körperkerntemperatur nach Open Field Stress über 240 Minuten im Vergleich zur Baseline innerhalb des Genotyps „KO“.

*** $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ und *** $P < 0,001$: Vergleich zwischen der Baseline und der Körperkerntemperatur nach Open Field Stress innerhalb des Genotyps „KO“**

Die schwarzen Pfeile markieren den Beginn des Open Field Stress durch Umsetzen der Tiere in den neuen Käfig (siehe Kapitel 8.7.2).

13.1.4. Aktivität der Mäuse nach Open Field Stress

Zusätzlich zur Körperkerntemperatur der Mäuse wurde die (je über 15 Minuten gemittelte) Gesamtaktivität der Mäuse während des Versuches (240 Minuten) als Aktivitätsmuster aufgezeichnet. Die Baseline war die kumulative Aktivität der Tiere über einen Zeitraum von 4 h, in welchem die Mäuse weder einer Behandlung noch einem Open Field Stress Versuch unterzogen wurden. Im Vergleich zwischen den beiden Genotypen „WT“ und „KO“ konnten bezüglich der Baseline keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Abbildung 13-5, A). Verglich man die Gesamtaktivität der Wildtyp-Mäuse mit der der NF-IL6-Knock-out-Mäuse fiel auf, dass bis zum Zeitpunkt 1,5 h nach Beginn des Open Field Stress Versuches die Gesamtaktivität der Wildtyp-Tiere um ~50 % höher war als die der Knock-out-Mäuse (Abbildung 13-5, B). Bis zum Zeitpunkt 2,5 h nach Beginn des Open Field Stress Versuches war die Gesamtaktivität der Wildtyp-Mäuse höher als die der Knock-out-Mäuse. Erst 3 h nach Beginn des Versuches überstieg die Gesamtaktivität der Knock-out-Mäuse kurzzeitig die Aktivität der Wildtyp-Mäuse. In Abbildung 13-5, C wird deutlich, dass die kumulative Aktivität der Wildtyp-Tiere nach dem Open Field Stress Versuch über 240 Minuten (4 h) signifikant (## $P < 0,01$) höher ist als die der Knock-out-Mäuse. Des Weiteren wird ersichtlich, dass die kumulative Aktivität beider Genotypen (WT und KO) nach Open Field Stress im Vergleich zu ihrer jeweiligen Baseline signifikant (*** $P < 0,001$ und ** $P < 0,01$) erhöht war. Zusammengefasst bedeutet dies, dass die NF-IL6-defizienten Mäuse sich zwar nach Einwirken eines Stressstimulus signifikant mehr bewegen als in einer Ruhesituation, aber verglichen mit ihrer Kontrollgruppen (Wildtyp-Tiere), zeigen sie eine deutlich reduzierte Bewegungsaktivität.

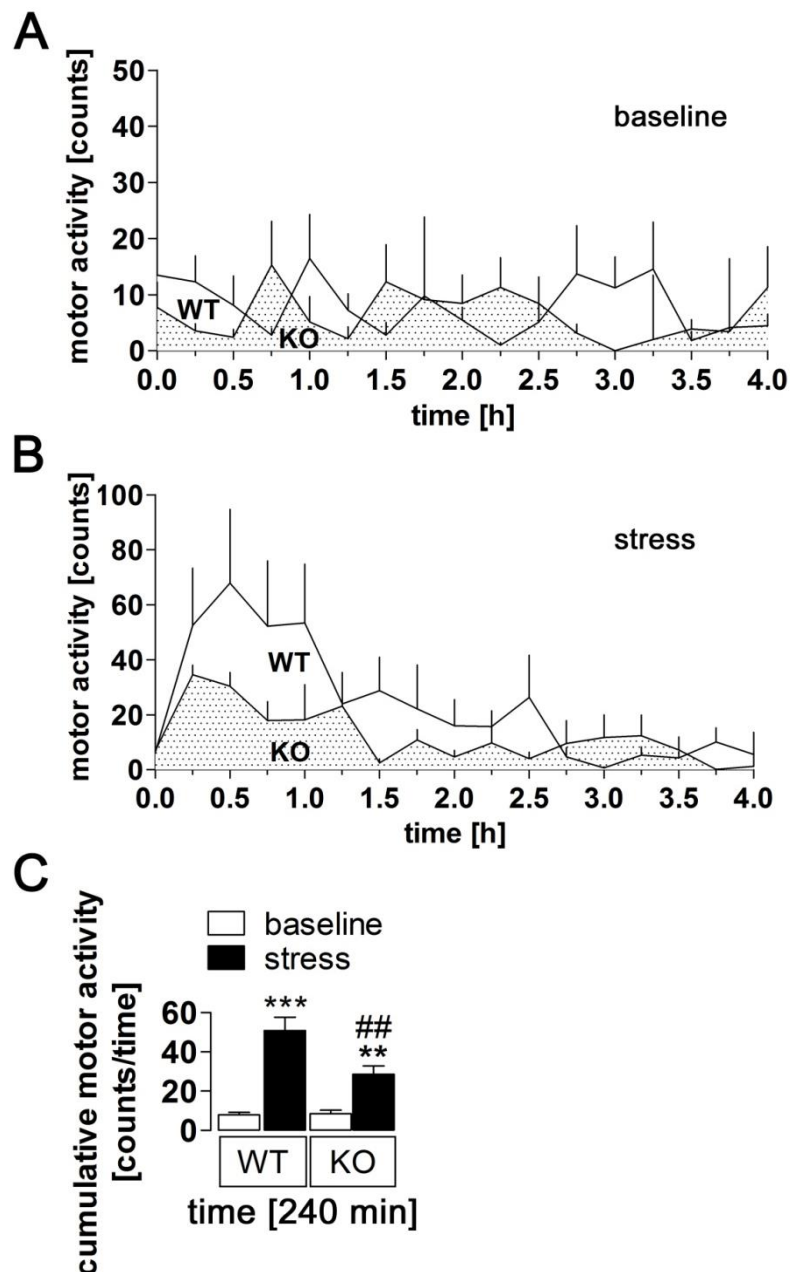


Abbildung 13-5

(A) Aktivitätsmuster (je über 15 Minuten gemittelte Gesamtaktivität) der Baseline der Mäuse des jeweiligen Genotyps (WT oder KO) über einen Zeitraum von 4 Stunden.

(B) Aktivitätsmuster (je über 15 Minuten gemittelte Gesamtaktivität) der gestressten Mäuse des jeweiligen Genotyps (WT oder KO) über die gesamte Versuchsdauer von 4 Stunden.

(C) Kumulative Aktivität der beiden Genotypen „Wildtyp-Maus (WT)“ und „NF-IL6-Knock-out-Maus (KO)“ nach Beginn des Open Field Stress über 240 Minuten, bzw. der Baseline als Vergleich.

Baseline: kumulative Aktivität der Mäuse über einen Zeitraum von 240 Minuten ohne Behandlung oder Stresseinwirkung

*** $P < 0,001$ und ** $P < 0,01$: Vergleich zwischen der Baseline und der kumulativen Aktivität nach Open Field Stress über einen Versuchszeitraum von 240 Minuten (4 h).

$P < 0,01$: Vergleich der kumulativen Aktivität zwischen dem Genotyp WT und KO über einen Versuchszeitraum von 240 Minuten (4 h).

13.2. Molekulare und immunhistochemische Analysen der Rattengehirne

Um einen Vergleich zwischen der möglichen Aktivierung von NF-IL6 durch einen infektiösen Stimulus (i.p. Injektion von 100 µg/kg KGW LPS) auf der einen Seite und einem nicht-infektiösen, psychologischen Stimulus auf der anderen Seite anstellen zu können, wurde NF-IL6 in den für diese Arbeit relevanten Bereichen (Hypothalamus und Hypophyse) immunhistochemisch untersucht. Es wurde im zeitlichen Verlauf der Zeitpunkt für die höchste Aktivität von NF-IL6 ermittelt und ein Bezug zu den bereits gewonnenen Erkenntnissen über physiologische Daten [Körperkerntemperatur, Konzentration von TNF-α und IL-6 (Abbildung 13-1)] hergestellt.

13.2.1. Open Field Stress induzierte Immunreaktivität von NF-IL6 in ausgewählten Regionen des Hypothalamus und in der Hypophyse der Ratte im zeitlichen Verlauf

semiquantitative analysis of nuclear NF-IL6 immunoreactivity							
time [min.]							
brain structure	stress					control	
	30	60	90	120	240	60	240
SFO	++ (3,7)	+ (2,7)	++ (3,7)	+ (3,0)	+ (3,3)	+ (3,0)	± (2,4)
PVN	± (2,3)	+ (3,4)	++ (4,2)	++ (4,3)	± (2,2)	± (2,2)	± (2,0)
pituitary	+ (3,3)	++ (4,3)	+++ (5,0)	+ (2,7)	+ (2,6)	+ (3,0)	± (2,3)

Tabelle 13-1

Semiquantitative Analyse der Menge nukleärer NF-IL6-Signale im *Organum subfornicale* (SFO), im *Nucleus paraventricularis* (PVN) und im Vorderlappen der Hypophyse (pituitary) der Ratte nach 30, 60, 90, 120 und 240 Minuten Stress, provoziert durch ein Open Field Stress Versuch bzw. nach 30 und 240 Minuten Kontrollsituation (ungestörtes Tier im ursprünglichen Käfig).

Eine Bewertung der relativen Dichte an Signalen wurde anhand eines Fünfpunkteschemas (siehe Kapitel 9.1.4) vollzogen und für jede Tiergruppe gemittelt: +++ (5) = hohe Dichte, ++ (4) = mittlere bis moderate Dichte, + (3) = niedrige Dichte, ± (2) = einzelne Signale in einigen Fällen, - (1) = keine Signale.

Es wurden 2 Schnitte pro Ratte für 3 oder 6 (für 60 und 240 Minuten) Ratten pro Gruppe ausgewertet.

Im SFO wurde kein eindeutiger Peak einer NF-IL6-Aktivierung ermittelt. Im PVN hingegen und auch in der Hypophyse war zum Zeitpunkt 90 und 120 Minuten nach Beginn des Open Field Stress ein deutlicher Anstieg der NF-IL6-Immunreaktivität zu verzeichnen, welcher nach 240 Minuten wieder zurückgegangen war.

13.2.1.1. *Organum subfornicale* (SFO)

Im SFO, welches zu den sensorischen Circumventrikulären Organen (sCVOs) zählt, konnten im Gegensatz zum PVN bereits zu einem frühen Zeitpunkt (30 Minuten nach Beginn des Open Field Stress) zahlreiche NF-IL6-immunreaktive Zellen detektiert werden. Auch 120 Minuten und 240 Minuten nach Beginn des Open Field Stress Versuches traten im SFO

immer noch deutliche NF-IL6-Signale auf. Bei den Kontrolltieren waren nach 60 bzw. 240 Minuten ebenfalls deutliche NF-IL6-immunreaktive Zellen detektierbar (Tabelle 13-1). Es konnte mittels semiquantitativer Bewertung kein signifikanter Anstieg oder Peak für das SFO ermittelt werden (Tabelle 13-1).

13.2.1.2. *Nucleus paraventricularis (PVN)*

Bei der Untersuchung des PVN des Hypothalamus von gestressten Ratten konnten zum Zeitpunkt 30 Minuten nach Beginn des Versuches keine oder nur sehr wenige NF-IL6-Signale identifiziert werden. Ab dem Zeitpunkt 60 Minuten bis 90 Minuten nach Beginn des Open Field Stress war die höchste Dichte und Intensität an NF-IL6-immunreaktiven Zellen zu verzeichnen, während nach 120 Minuten bereits ein Rückgang der Signale sichtbar wurde (Tabelle 13-1). Nach 240 Minuten waren nur sehr wenige NF-IL6-immunreaktive Zellen detektierbar. Die Kontrolltiere zeigten zum Zeitpunkt von 60 und 240 Minuten ebenfalls eine sehr geringe Anzahl von NF-IL6-immunreaktiven Zellen. Zusätzlich wurde eine semiquantitative Bewertung der NF-IL6-Signale mittels einer Bewertungsskala vorgenommen, die diese Beobachtung zusätzlich bestätigten. Wenn man das immunhistochemische Bild des PVN des Hypothalamus einer Ratte nach drei unterschiedlichen Behandlungen (i.p. Saline- oder LPS-Injektion und psychologischer Stimulus nach Open Field Stress) miteinander vergleicht, fällt auf, dass nach der Saline-Behandlung (A) kaum NF-IL6-Signale vorhanden sind. Im Gegensatz dazu ist nach der LPS-Behandlung (B) sowohl im Ependym des dritten Ventrikels als auch im PVN eine große Anzahl an NF-IL6-Signalen von starker Intensität vorhanden, die teilweise mit Endothelzellen colokalisieren. Nach einem psychologischen Stimulus (C) sind sowohl im Ependym des dritten Ventrikels als auch im PVN NF-IL6-positive Zellen vorhanden, die allerdings nicht so zahlreich und intensiv vorliegen und auch keine Colokalisation mit Endothelzellen zeigen (Abbildung 13-6, A-C).

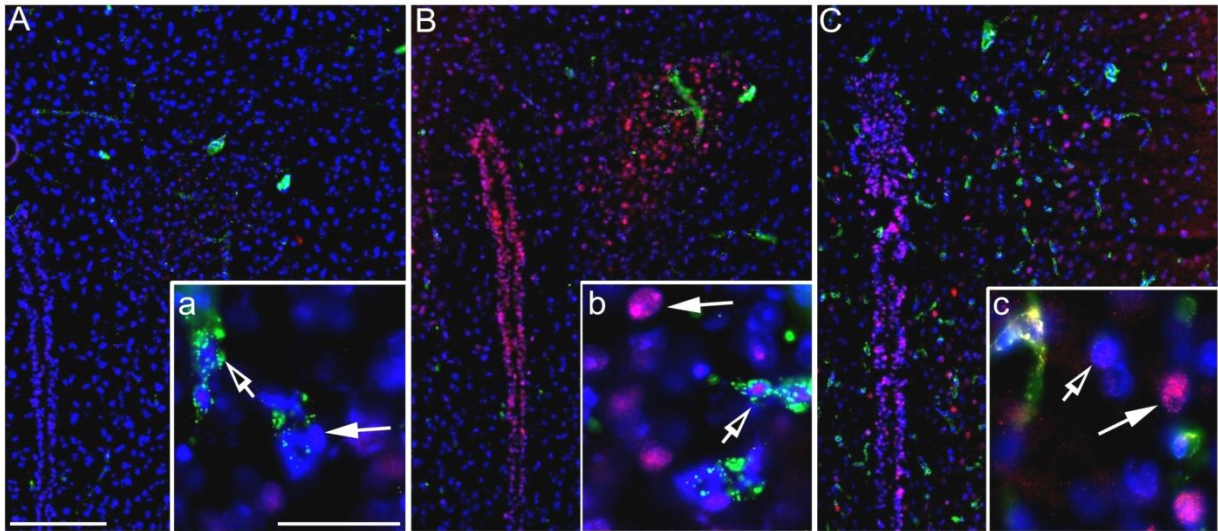


Abbildung 13-6

Vergleichende Darstellung der NF-IL6-Immunreaktivität (in Rot) im *Nucleus paraventricularis* (PVN) des Hypothalamus einer Ratte nach einer i.p. Saline-Injektion (A, 8 h), einer i.p. LPS-Injektion (100 µg pro kg KGW, 8 h, B) und nach einem Stressestimulus (Open Field Stress, 90 Minuten, C). Im blauen Kanal ist die Zellkernfärbung (DAPI), in Grün der Zellmarker von Willebrand Faktor (vW) für Endothelzellen zu erkennen. Der Größenmarker entspricht in A-C 200 µm und in allen Detailaufnahmen a-c 20 µm.

In den repräsentativen Übersichtsbildern, gekennzeichnet mit den Großbuchstaben A-C, sind der dritte Ventrikel und der rechte Anteil des PVN zu erkennen. In den Detailaufnahmen, gekennzeichnet durch die Kleinbuchstaben a-c, ist ein vergrößerter Ausschnitt aus dem rechten Anteil des PVN dargestellt. Der geschlossene Pfeil zeigt in (a) das Nicht-Vorhandensein eines NF-IL6-Signals und in (b) und (c) jeweils eine NF-IL6-positive Zelle. Der offene Pfeil zeigt in (a) und (b) eine Endothelzelle (in Grün) an und in (c) eine Zelle, die nicht NF-IL6-positiv ist und auch nicht zu den Endothelzellen gezählt werden kann.

Nur nach einem infektiösen Stimulus (100 µg/kg KGW LPS) und nicht nach einem psychologischen Stimulus, ist eine deutliche Colokalisation des NF-IL6-Signals mit den Endothelzellen sichtbar (Bb).

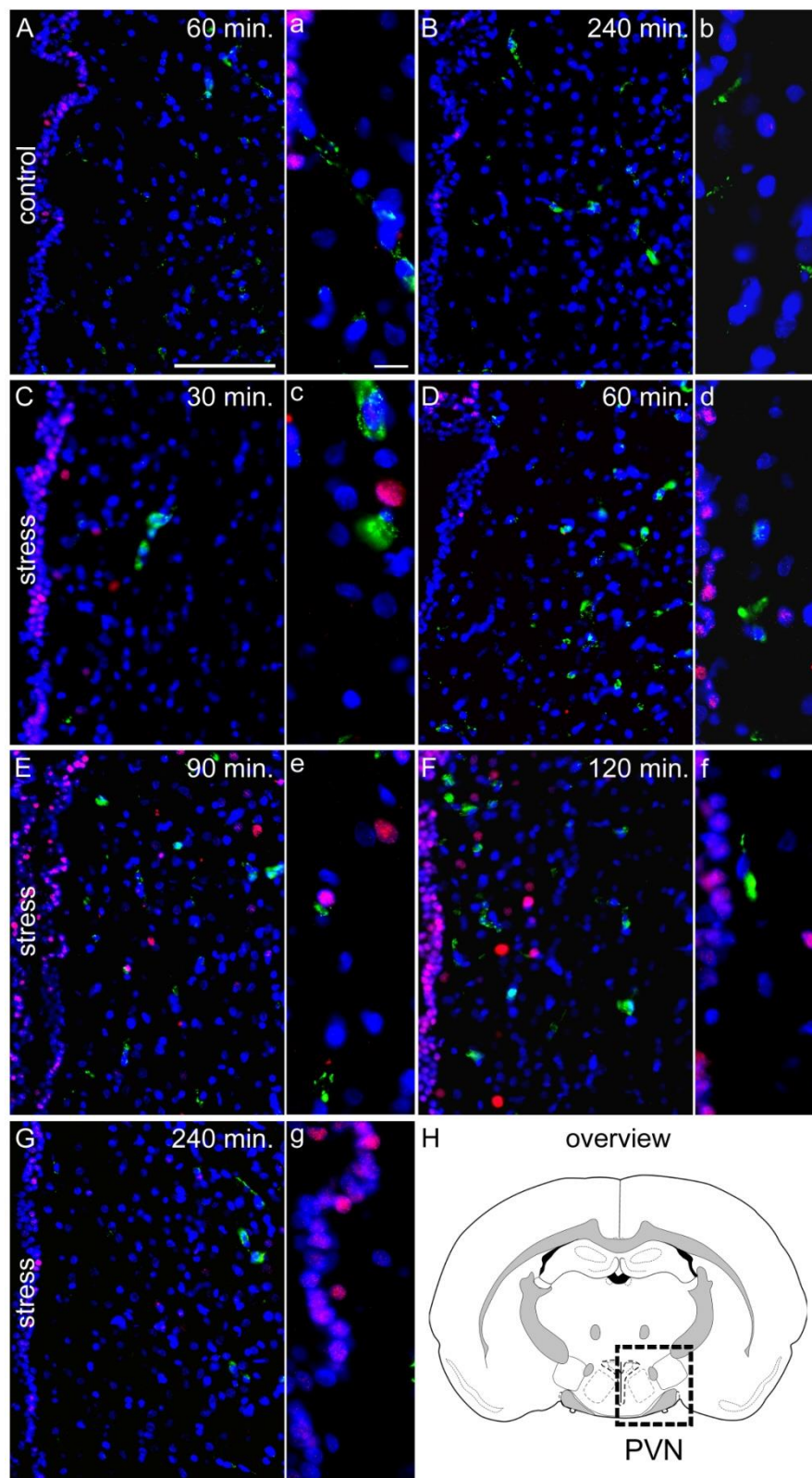


Abbildung 13-7

Repräsentative Fotos zur Verteilung der NF-IL6-immunreaktiven Zellen (in Rot) im *Nucleus paraventricularis* (PVN) des Hypothalamus der Ratte nach einem psychologischen Stressstimulus (Open Field Stress) im Vergleich zu ihren Kontrolltieren zu unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten (30, 60, 90, 120 und 240 Minuten).

In den Übersichtsaufnahmen (A-G) sind der rechte Bereich des Ependyms des dritten Ventrikels und die rechte Seite des PVN zu erkennen und in den Detailaufnahmen (a-g) sind meist sowohl Ependymzellen als auch Zellen des PVN vergrößert dargestellt. Im blauen Kanal ist die Zellkernfärbung (DAPI), in Grün der Zellmarker für Endothelzellen (vW) und in Rot die NF-IL6-immunreaktiven Zellen zu erkennen. Der Größenmarker in den Übersichtsaufnahmen (A-G) entspricht 50 µm und in den Detailaufnahmen (a-g) 10 µm. In (H) ist eine Übersichtszeichnung zur schematischen Darstellung des PVN abgebildet.

Bei den Kontrolltieren (A und B bzw. a und b) sind nach 60 und 240 Minuten einzelne NF-IL6-positive Zellen im Ependym des dritten Ventrikels sichtbar. Colokalisationen mit Endothelzellen liegen nicht vor.

Bei den durch ein Open Field Stress Versuch stimulierten Ratten traten bereits 30 bzw. 60 Minuten nach Versuchsbeginn deutliche NF-IL6-Signale im PVN auf. Die Anzahl und Intensität der Signale hatte sich bis zum Zeitpunkt 90 Minuten erhöht und diese waren auch 120 Minuten nach Versuchsstart noch deutlich detektierbar. Erst nach 240 Minuten gingen die NF-IL6-Signale deutlich zurück und waren vorwiegend auf das Ependym des dritten Ventrikels beschränkt.

13.2.1.3. Hypophysenvorderlappen (HVL)

In der Hypophyse zeigte sich eine gewisse Grundaktivität von nukleären NF-IL6 Signalen, welche allerdings durch den psychologischen Stimulus im Open Field zusätzlich deutlich erhöht wurde (Abbildung 13-8). Die Vermutung, dass eine konstitutive Expression von NF-IL6 vorliegt, wurde dadurch bestätigt, dass auch im HVL der Kontrolltiere (zum Zeitpunkt 60 und 240 Minuten) einzelne Signale bis hin zu einer geringen Dichte an NF-IL6-Signalen zu verzeichnen war. Bei den Ratten, die dem psychologischen Stressstimulus ausgesetzt waren, konnte bereits 30 Minuten nach Beginn des Versuches eine geringe Dichte an NF-IL6-Signalen detektiert werden, die sich nach 60 Minuten deutlich steigerte, um dann nach 90 Minuten ihr Maximum bei stärkster Signalintensität zu erreichen. Nach 120 bzw. 240 Minuten ging sowohl die Anzahl als auch die Intensität der Signale auf moderate Werte bzw. einzelne zu detektierende nukleäre Signale zurück (Abbildung 13-8).

Vor allem im Übergang von Vorderlappen zu Zwischenlappen konnten die meisten NF-IL6-positiven Zellen mit der stärksten Intensität detektiert werden (gekennzeichnet durch das Sonderzeichen §). Nicht nur im Vorderlappen, sondern auch im Hinterlappen konnten 60 Minuten nach Beginn des Open Field Stress Versuches wenige NF-IL6-positive Zellen detektiert werden, deren Anzahl zum Zeitpunkt 90 Minuten weiter anstieg, um dann nach 120 Minuten wieder abzunehmen. 240 Minuten nach Beginn des Versuches waren im Hinterlappen fast keine NF-IL6-positiven Zellen mehr sichtbar.

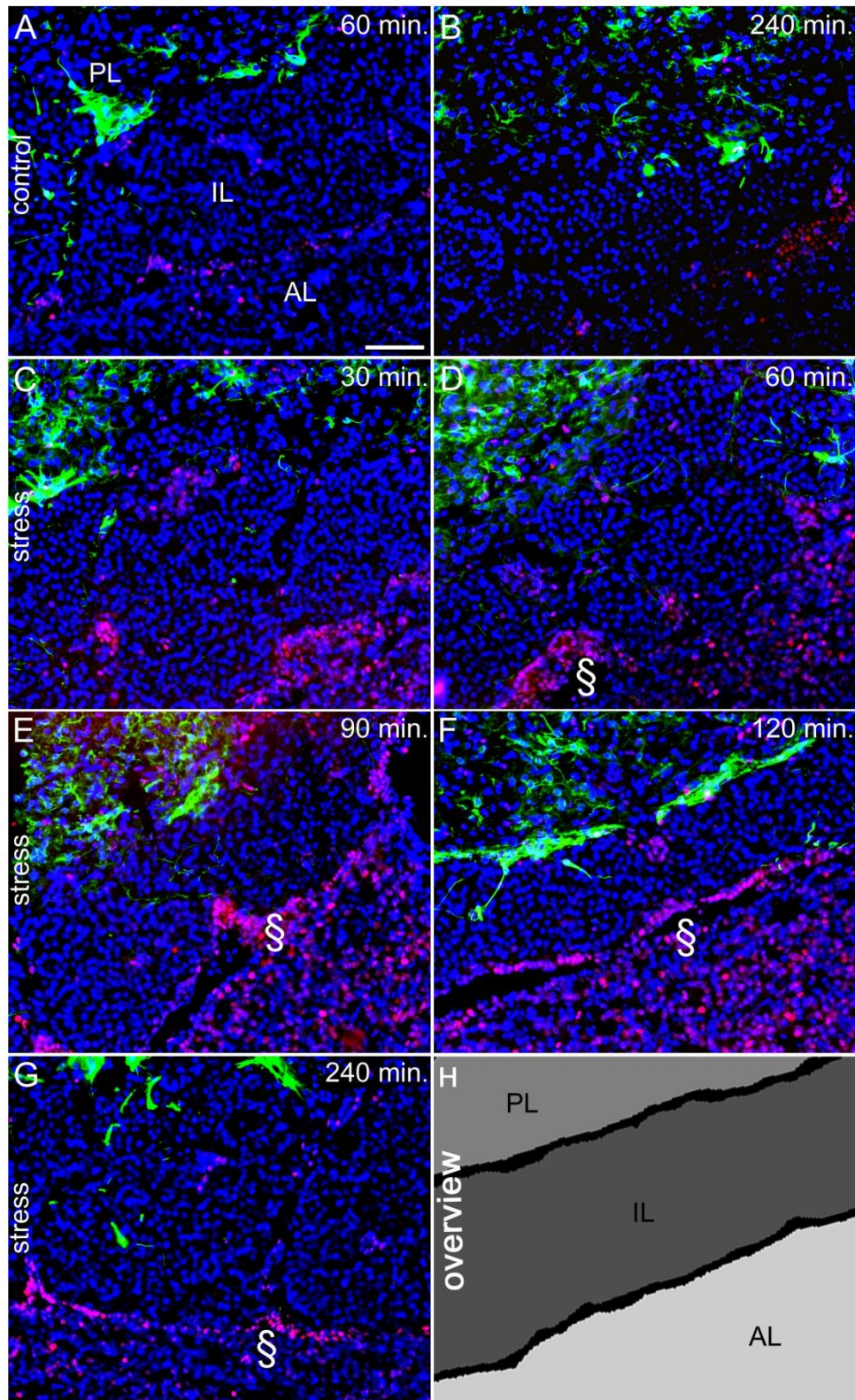


Abbildung 13-8

Zeitverlauf der NF-IL6-Expression (in Rot) nach Open Field Stress (30-, 60-, 90-, 120 und 240 Minuten; C-G) im Vergleich zur Kontrollgruppe (60 und 240 Minuten; A und B) in der Hypophyse von Ratten. Die Aufteilung in Hinterlappen (PL), Zwischenlappen (IL) und Vorderlappen (AL) ist gut zu unterscheiden und in der schematischen Übersicht (Overview) exemplarisch dargestellt (H). Die Überlagerung mit dem Zellkernsignal (DAPI, Blau) ist durch die Pinkfärbung erkennbar. In Grün ist der Zellmarker für Pituizyten (GFAP) dargestellt.

Allgemein lässt sich im Vorderlappen (AL) und weniger deutlich auch im Hinterlappen (PL) der Hypophyse ein Unterschied zwischen gestressten und nicht gestressten Tieren erkennen. Die stärkste Intensität und Zunahme der Anzahl der NF-IL6-Signale im Vorderlappen ist deutlich zum Zeitpunkt 90 und 120 Minuten nach Beginn des psychologischen Stressstimulus (Open Field Stress) detektierbar. Des Weiteren stellen speziell die Übergänge von Vorderlappen (AL) zu Zwischenlappen (IL) einen Bereich mit hoher Signaldichte und Intensität dar und wurden deshalb mit dem Sonderzeichen § ausgestattet. Auch im Hinterlappen (PL) konnten zum Zeitpunkt 60 Minuten einige wenige NF-IL6-positive Zellen detektiert werden, deren Anzahl zum Zeitpunkt 90 Minuten anstieg, um dann nach 120 Minuten wieder abzunehmen. 240 Minuten nach Beginn des Versuches waren im Hinterlappen (PL) keine NF-IL6-positiven Zellen mehr sichtbar.

Der Größenmarker entspricht 100 µm in allen Aufnahmen (A-G).

13.2.2.NFκB und STAT3-Aktivität

Die Transkriptionsfaktoren NFκB und STAT3 waren im Gegensatz zur LPS-Injektion nach Open Field Stress zu keinem der untersuchten Zeitpunkte immunhistochemisch detektierbar (Daten nicht gezeigt).

13.2.3.Identifizierung der verschiedenen NF-IL6-positiven Zellpopulationen

Nachdem die Verteilung, Anzahl und Intensität der NF-IL6-Signale nach einem psychologischen Stimulus (Open Field Stress) untersucht worden waren, folgte die Zuordnung der reaktiven Zellen zu ihren jeweiligen Zellphänotypen. Diese qualitativen Untersuchungen wurden zum ermittelten Zeitpunkt maximaler NF-IL6-Reaktivität 90 Minuten nach Beginn des Versuches durchgeführt.

13.2.3.1. Endothelzellen (vW)

Durch die Detektion des Proteins „von Willebrand Faktor“ (vW) konnten Endothelzellen der Hypophyse dargestellt werden (Abbildung 13-9, C und D). Allerdings wiesen diese nach Open Field Stress weder im Vorderlappen (AL) noch im Hinterlappen (PL) eindeutig identifizierbare Colokalisation mit NF-IL6 Signalen auf. Dies stellt einen deutlichen Unterschied zu NF-IL6-reaktiven Endothelzellen dar, die nach einer i.p. Injektion mit LPS (100 µg/kg KGW) auftraten (Abbildung 13-9, C und D).

13.2.3.2. Pituizyten (GFAP)

Durch die Detektion des Proteins „glial fibrillary acidic protein“ (GFAP) konnten die Pituizyten des Hypophysenhinterlappens (PL) markiert werden, wobei keine Colokalisation mit einem zuvor detektierten NF-IL6-Signal festgestellt werden konnte. Dies stellt, wie auch im Fall der Endothelzellen, einen wichtigen Unterschied zu den durch einen infektiösen Stimulus (100 µg/kg KGW LPS) aktivierten NF-IL6-immunreaktiven Pituizyten dar (Abbildung 13-9, A und B).

13.2.3.3. CD163

Ein Teil der in der gesamten Hypophyse [Vorderlappen (AL) und Hinterlappen (PL)] anzutreffenden perivaskulären Makrophagen, die anhand des Zellmarkers „cluster of

differentiation 163“ (CD163) detektiert wurden, wiesen als einzige identifizierte Zellpopulation nach Open Field Stress eine NF-IL6 Immunreaktivität auf (Abbildung 13-9, E und F). Ein Teil der NF-IL6-Signale war auch in Zellen lokalisiert, die nicht mit CD163 colokalisierten und somit in der vorliegenden Arbeit nicht phänotypisiert werden konnten.

13.2.3.4. ACTH

Die im Hypophysenvorderlappen (AL) vorkommenden ACTH-produzierenden Zellen wurden anhand eines Antikörpers gegen ACTH (Bläher, 1988) markiert. Es traten keinerlei Colokalisationen mit NF-IL6-immunreaktiven Zellen auf, was nochmals einen beachtenswerten Unterschied im Vergleich zu einem infektiösen Stimulus (100 µg/kg KGW LPS) darstellt (Abbildung 13-10, A und B). Da der Antikörper auch das Prohormon POMC detektiert, war auch der Zwischenlappen positiv für ACTH markiert, allerdings ohne Colokalisation mit NF-IL6. Bisher konnten in keiner der vorgenommenen Untersuchungen NF-IL6-Signale im Zwischenlappen der Hypophyse detektiert werden.

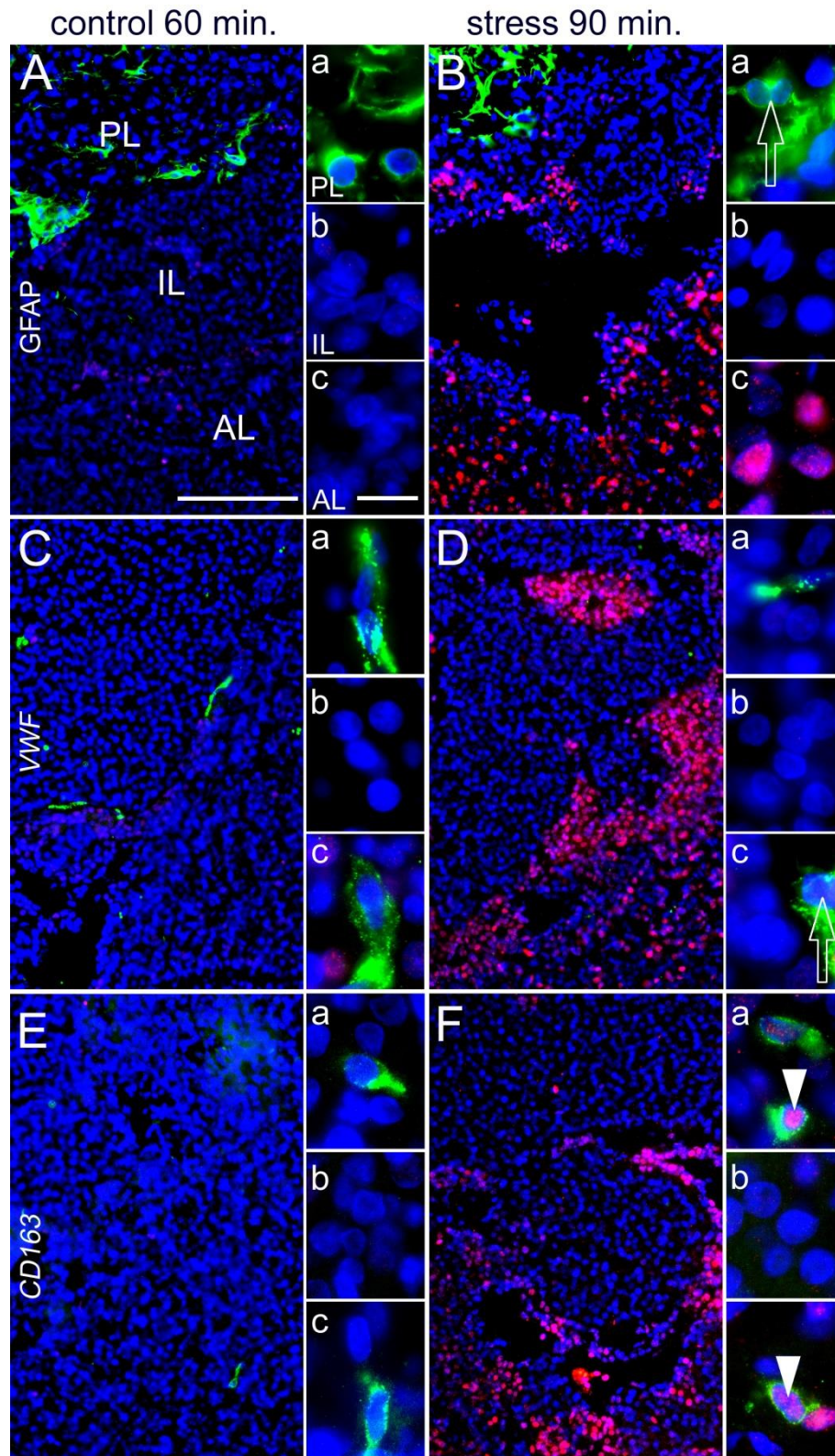


Abbildung 13-9

Qualitative Untersuchung und Zuordnung der NF-IL6-reaktiven Zellen zu ihren jeweiligen Zellpopulationen/Zellphänotypen zum Zeitpunkt 90 Minuten nach Beginn des Open Field Stress Versuches (repräsentative Fotos).

In der Übersicht (gekennzeichnet mit Großbuchstaben) sind alle drei Anteile [Vorderlappen (AL), Zwischenlappen (IL), Hinterlappen (PL)] und in den Detailaufnahmen (gekennzeichnet mit Kleinbuchstaben) ist ein Ausschnitt aus dem jeweiligen Anteil zu sehen.

Der Größenmarker entspricht in den Übersichten (A-F) 100 μm und in allen Detailaufnahmen (a-c) 10 μm . In allen Aufnahmen sind die Zellkerne im blauen Kanal dargestellt (DAPI-Kernfärbung).

Eine Colokalisation der jeweiligen Zelltypen mit NF-IL6 (in Rot) konnte nach Einwirken eines psychologischen Stressstimulus nur in perivaskulären Makrophagen (E und F, Zellmarker: „cluster of differentiation“ 163, CD163) und weder in GFAP-positiven Pituizyten (A und B, Zellmarker: glial fibrillary acidic protein, GFAP) noch in vWF-positiven Endothelzellen (C und D, Zellmarker: von Willebrand-Faktor) nachgewiesen werden.

Die offenen Pfeile zeigen nicht-NF-IL6-positive Zellkerne und die Pfeilspitzen zeigen NF-IL6-positive Zellen die mit CD163 colokalisieren.

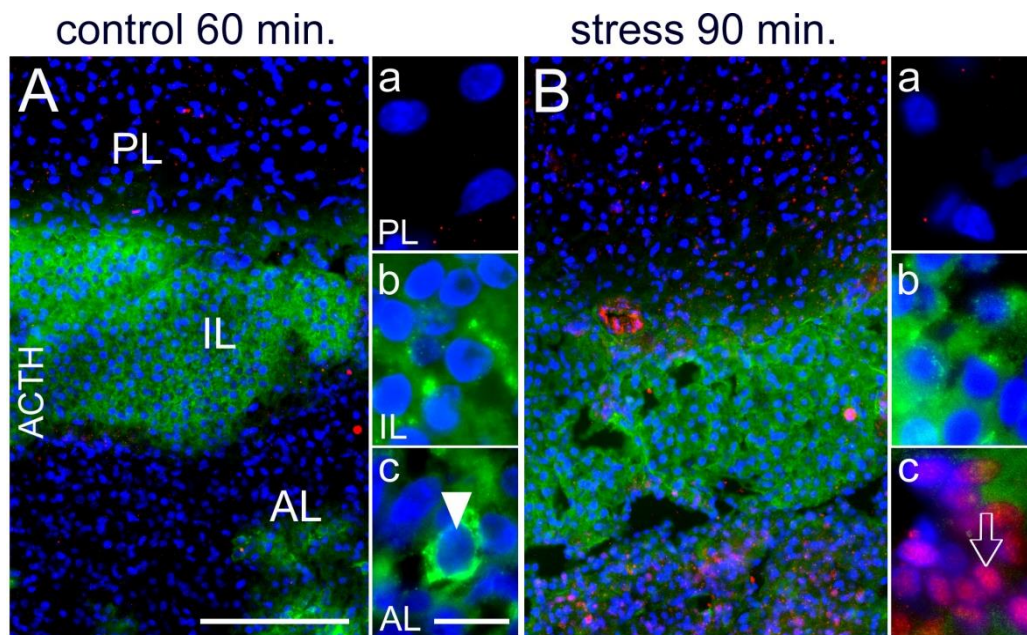


Abbildung 13-10

Qualitative Untersuchung der NF-IL6-Expression (in Rot) und Colokalisation mit ACTH-positiven Zellen (in Grün) in der Hypophyse zum Zeitpunkt 90 Minuten nach Beginn des Open Field Stress bzw. zum Zeitpunkt 60 Minuten in der Kontrollgruppe (repräsentative Fotos). Die Zellkerne sind im blauen Kanal dargestellt (DAPI-Kernfärbung) und der Größenmarker in A und B entspricht 100 μm und in allen Detailaufnahmen (a-c) 10 μm .

In der Übersicht (gekennzeichnet mit Großbuchstaben) sind alle drei Anteile [Vorderlappen (PL), Zwischenlappen (IL), Hinterlappen (PL)] und in den Detailaufnahmen (gekennzeichnet mit Kleinbuchstaben) ist ein Ausschnitt aus dem jeweiligen Anteil zu sehen. Die Pfeilspitze kennzeichnet eine ACTH-positive Zelle im Vorderlappen (AL, Ac) der Hypophyse eines Kontrolltieres zum Zeitpunkt 60 Minuten und der offene Pfeil markiert eine nicht ACTH- aber NF-IL6-positive Zelle im Vorderlappen nach Open Field Stress (Bc). Es ist keine Colokalisation von NF-IL6 und ACTH in einer Zelle des Vorderlappens der Hypophyse nach Open Field Stress sichtbar.

13.2.4. Induktion von inflammatorischen Markern auf mRNA- Ebene im Hypothalamus und in der Hypophyse

Nachdem erste Erkenntnisse über die Verteilung und Aktivierung von NF-IL6 nach einem psychologischen Stressstimulus auf Proteinebene gewonnen worden waren, sollte im nächsten Schritt untersucht werden, ob die gewonnenen Ergebnisse auch auf mRNA-Ebene bestätigt werden können. Dafür wurde Gehirngewebe aus dem Hypothalamus bzw. die gesamte Hypophyse genutzt. Zunächst wurde die zeitliche Entwicklung der Geninduktion untersucht (30, 60, 90, 120 und 240 Minuten nach Beginn des Open Field Stress), wobei als Vergleichsgruppe die Kontrolltiere des Open Field Stress Versuches (Zeitpunkt 60 und 240 Minuten) herangezogen wurden. Im Fall der untersuchten Hypophysen wurden zum Vergleich zusätzlich Proben von Ratten verwendet, die 100 µg/kg KGW LPS i.p. erhalten hatten und 8 Stunden p.i. perfundiert worden waren.








hypothalamus		pituitary		
open field stress	control	open field stress	control	100 µg/kg KGW LPS
time [min.] 30 60 90 120 240	time [min.] 60 240	time [min.] 60 240	time [min.] 60 240	time [h] 8
 		 		

Abbildung 13-11

Schematische Übersicht über die für die RT-PCR verwendeten Versuchsgruppen.

Die Aufteilung erfolgt nach den verwendeten Geweben (Hypothalamus oder Hypophyse), untersuchten Zeitpunkten und angewendeten Stimuli (psychologisch mittels Open Field Stress oder infektiös mittels i.p. LPS-Injektion).

13.2.4.1. Transkriptionsfaktoren im Hypothalamus der Ratte

Die Gehalte an mRNA der Transkriptionsfaktoren NF-IL6 und NFκB (NFκB anhand IκBα-mRNA-Expression) wiesen im zeitlichen Verlauf (30 bis 240 Minuten nach Beginn des Open Field Stress) keine signifikanten Unterschiede zu den Kontrolltieren auf. Auch die Induktion von SOCS3 als negativer Regulator von STAT3, zeigte zu keinem der untersuchten Zeitpunkte eine signifikante Abweichung zur jeweiligen nicht gestressten Kontrollgruppe. Lediglich der Gehalt an POMC-mRNA wies im Vergleich eine signifikante (*P<0,05) Erniedrigung auf (Abbildung 13-12).

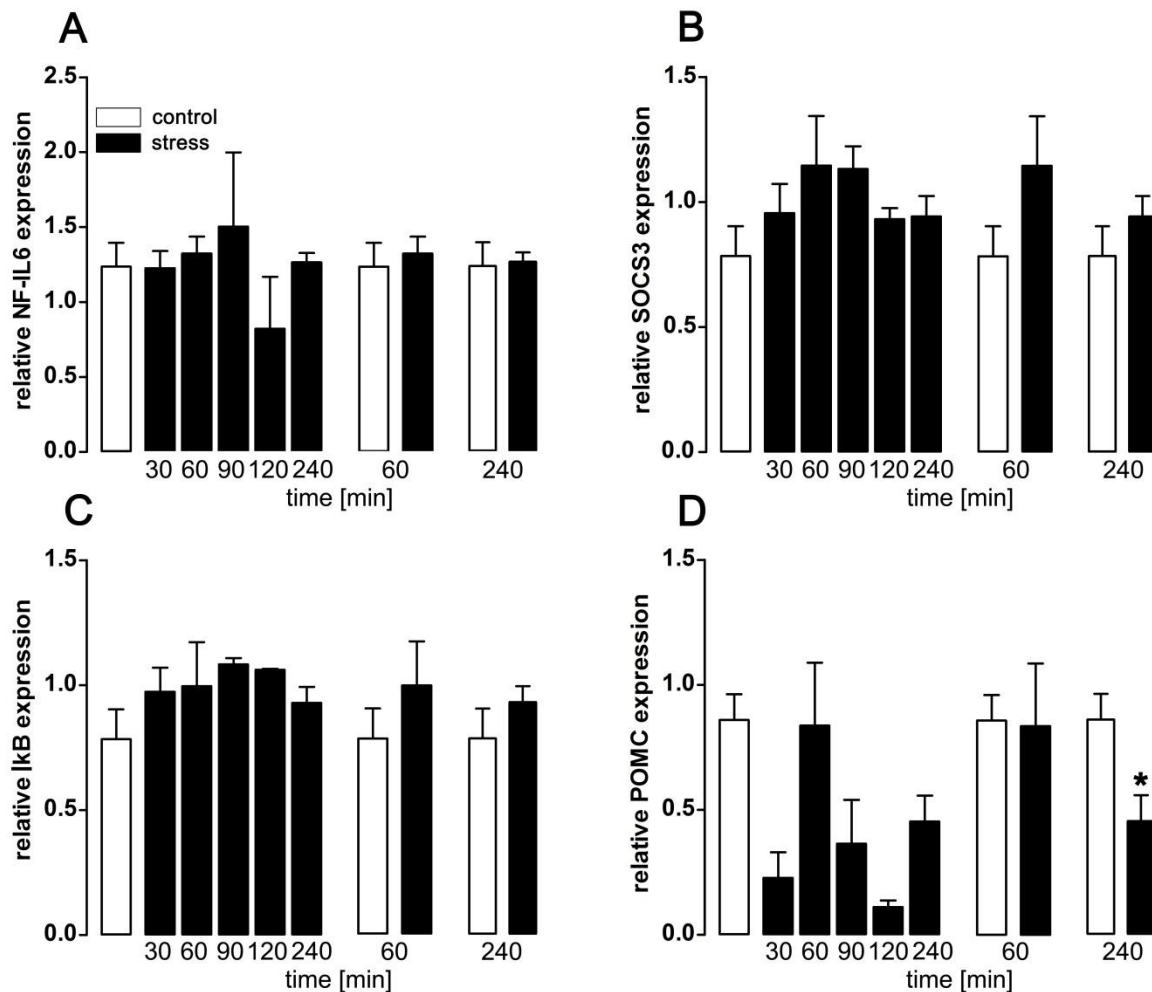


Abbildung 13-12

Darstellung der Induktion der mRNA-Expression inflammatorischer Marker NF-IL6 (A), SOCS3 (B) und IκBα (C) und des Prohormons POMC (D) im Hypothalamus der Ratte nach Open Field Stress (schwarz) zum Zeitpunkt 30, 60, 90, 120 und 240 Minuten im Vergleich zur Kontrolle zum Zeitpunkt 60 und 240 Minuten (weiß). Die Kontrollen sind links gepoolt dargestellt, und wurden im Einzelvergleich mit den Stresszeitpunkten 60 und 240 Minuten (rechts) nochmals gesondert betrachtet. Ausschließlich bei der Untersuchung der Genexpression von POMC wurde zum Zeitpunkt 240 Minuten eine signifikante Erniedrigung im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich (* $P < 0,05$).

13.2.4.2. Transkriptionsfaktoren in der Hypophyse der Ratte

Die Induktion der Genexpression von NF-IL6, des negativen Regulators IκBα (für NFκB), sowie des negativen Regulators SOCS3 (für STAT3) und des Prohormons POMC wies zu keinem der untersuchten Zeitpunkte einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Die mit LPS (100 µg/kg KGW) stimulierten Ratten zeigten wie zu erwarten eine deutliche Induktion der NF-IL6-, IκBα- und SOCS3-Expression. Die Gehalte an POMC-mRNA in der Hypophyse zeigten tendenziell eine Erniedrigung der Werte zum Zeitpunkt 240 Minuten nach Beginn des Open Field Stress (Abbildung 13-13).

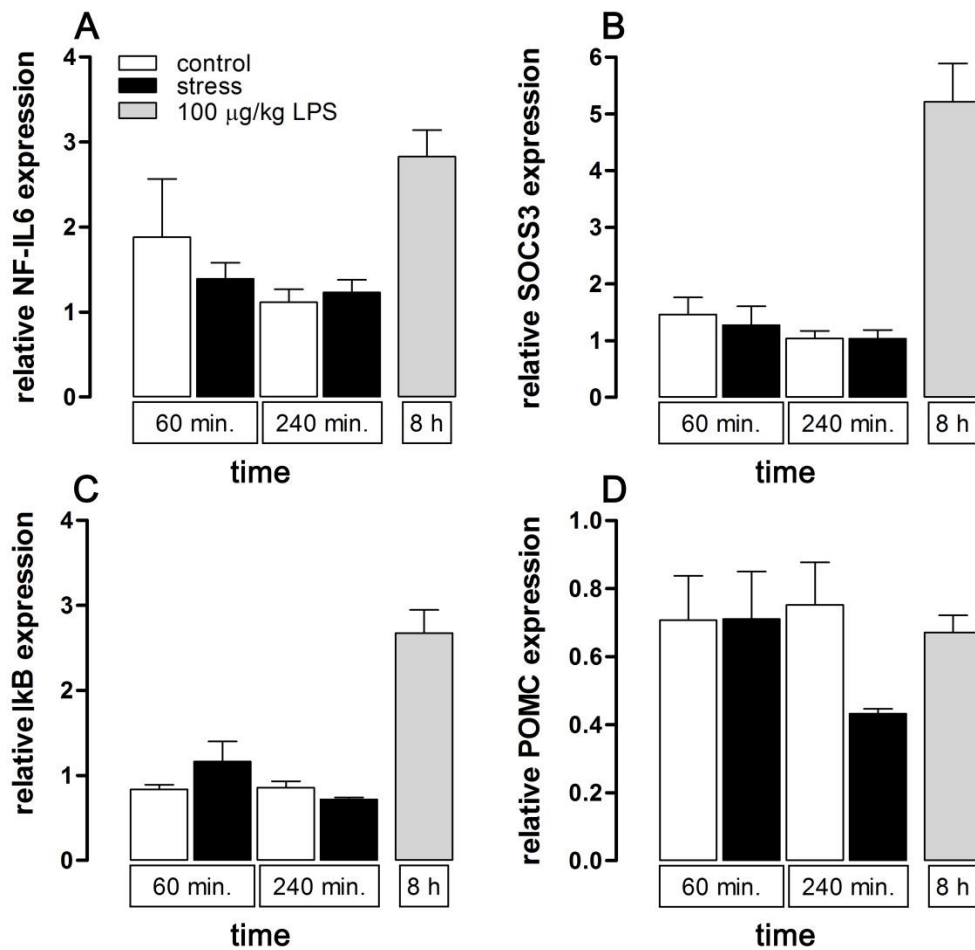


Abbildung 13-13

Darstellung der Induktion der mRNA-Expression inflammatorischer Marker NF-IL6 (A), SOCS3 (B) und IκBα (C) und des Prohormons POMC (D) in der Hypophyse der Ratte nach einem psychologischen Stressstimulus (schwarz) im Vergleich zu den Kontrolltieren (weiß) zum Zeitpunkt 60 und 240 Minuten. Zusätzlich wurde die Induktion der Genexpression nach einem inflammatorischen Stimulus (i.p. Injektion von 100 µg/kg KGW LPS) zum Zeitpunkt 8 h vergleichend betrachtet. Zwischen den gestressten und den nicht-gestressten Tieren konnten zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede detektiert werden.

14. Charakterisierung der Bedeutung von Zytokinen für die Aktivierung von NF-IL6 bei LPS-induzierten Entzündungen anhand primärer Zellkulturen des HVL der Ratte

14.1. Immunzytochemische Analysen und Messung von Zytokinen in Überständen der primären HVL-Zellkultur

14.1.1. Versuchsgruppen

sf medium	IL-1 β	PBS +					LPS +				
		PBS	TNF α -AB	IL-6-AB	IL-10-AB	AG490	LPS	TNF α -AB	IL-6-AB	IL-10-AB	AG490

Abbildung 14-1

Schematische Darstellung der für die primäre HVL-Zellkultur verwendeten Versuchsgruppen.

Alle verwendeten primären Zellkulturen wurden 24 h vor Versuchsbeginn mit serumfreien Medium inkubiert, um mögliche Auswirkungen des Serums auf die Zytokinproduktion der HVL-Zellen auszuschließen. Das Zytokin IL-1 β wurde als Positivkontrolle genutzt, da es eine ähnlich stimulierende Wirkung auf die Zellen hatte wie LPS. Des Weiteren wurden alle Kulturen sowohl ausschließlich mit PBS bzw. LPS als auch zusätzlich mit dem jeweiligen Zytokinantikörper inkubiert. Schließlich wurde die mögliche Wirkung des JAK-STAT-Inhibitors AG490 getestet. Dieser wurde genauso wie die Zytokin-Antikörper vor der üblichen PBS- bzw. LPS- Stimulation für 30 Minuten mit der entsprechenden Zellkultur inkubiert.

Es wurden pro Versuchsgruppe 3 unabhängige Versuche durchgeführt mit jeweils 2-4 Wells.

Insgesamt wurden 16 unabhängige Versuche durchgeführt.

14.1.2. TNF- α - und IL-6-Konzentrationen nach LPS-Stimulation

Um die Beteiligung einzelner Zytokine an der LPS-induzierten NF-IL6-Aktivierung zu untersuchen, wurde von allen herangezögten primären Zellkulturen des HVL 6 h nach Stimulation der Zellen mit 100 μ g/ml LPS (bzw. PBS als Kontrollsubstanz) und der Inkubation mit einem Zytokinantikörper der gesamte Überstand entnommen (Messung von bioaktivem TNF- α und IL-6 mittels Bioassay). Als zusätzlicher Vergleich wurde der Überstand von Proben entnommen, die mit serumfreien und serumhaltigen Medium über 24 h inkubiert und weder mit PBS noch mit LPS stimuliert worden waren, um die Wirkung von Serum auf die Produktion von Zytokinen in der Zellkultur zu analysieren. Der Einsatz von Serum hatte schon in früheren Studien zu unerwünschten Nebenwirkungen in Zellkulturen geführt (Pirkmajer and Chibalin, 2011) und da auch hier ein Eigeneffekt in den vorliegenden Untersuchungen zu beobachten war, wurde für alle weiteren Versuche nach ausreichendem Wachstum der Zellen serumfreies Medium 24 h vor Versuchsbeginn in den Zellkulturen verwendet.

14.1.2.1. TNF- α

Die Gehalte an bioaktivem TNF- α in den ausschließlich mit PBS behandelten Kulturen lagen nach 6 h tendenziell noch unter den Werten der mit serumfreien Medium (sf) inkubierten und somit nicht-stimulierten Proben (24 h). Die vorausgehende 30-minütige Inkubation mit einem IL-6- oder IL-10-Antikörper führte in PBS-stimulierten Wells zu keinem Abfall an TNF- α im Überstand. Der TNF- α -Antikörper (1 μ l/ml) bewirkte allerdings eine vollständige Abnahme der gemessenen Bioaktivität des Zytokins bis unter die Detektionsgrenze von 6 pg/ml. Die Stimulation der Zellen mit LPS führte ausnahmslos zu einem starken Anstieg der TNF- α -Konzentration (Abbildung 14-2, A). Im Fall der vorherigen Inkubation mit dem IL-6- oder IL-10-Antikörper kam es, im Vergleich zur Kontrolle mit PBS sowie im Vergleich zu den mit serumfreien Medium inkubierten Proben, zu einer signifikanten Zunahme (***) $P < 0,001$; ### $P < 0,001$ und §§§ $P < 0,001$) von TNF- α im Überstand (Abbildung 14-2, A). Interessanter Weise führte die Behandlung mit IL-6- oder IL-10-Antikörpern und zusätzlicher LPS-Gabe sogar zu einer Erhöhung der TNF- α -Konzentrationen im Vergleich zur alleinigen LPS-Stimulation. Im Gegensatz hierzu erreichte trotz LPS-Stimulation die Konzentration an TNF- α nach Vorbehandlung mit dem TNF- α -Antikörper keinen signifikanten Anstieg. Die Behandlung der Zellen mit dem proinflammatorischen Zytokin IL-1 β erzielte einen ähnlich hohen Anstieg an TNF- α wie die Stimulation durch LPS, welcher aber im Vergleich zu den mit LPS stimulierten und zuvor mit IL-6- oder IL-10-Antikörper inkubierten Proben signifikant niedriger (§§§ $P < 0,001$) war (Abbildung 14-2, A).

14.1.2.2. IL-6

Die Gehalte an bioaktivem IL-6 in den ausschließlich mit PBS behandelten Kulturen lagen nach 6 h tendenziell unter den Werten der mit serumfreien Medium (sf) inkubierten und somit nicht-stimulierten Proben (24 h). Die Inkubation mit dem IL-6- oder IL-10-Antikörper und anschließende PBS-Behandlung bewirkte ebenfalls nur eine Tendenz, aber keine signifikante Abnahme der IL-6-Konzentration im Überstand (Abbildung 14-2, B). Die Stimulation der HVL-Zellen mit LPS führte im Vergleich zur Kontrolle mit PBS, den mit serumfreien Medium inkubierten Proben sowie der Stimulation der Zellen mit IL-1 β zu einem deutlichen und signifikanten (***) $P < 0,001$; ### $P < 0,001$ und §§§ $P < 0,001$) Anstieg der IL-6 Konzentration (Abbildung 14-2, B). Die 30-minütige Vorinkubation mit dem IL-6- bzw. IL-10-Antikörper führte in Verbindung mit der LPS-Stimulation zu einer signifikanten Erniedrigung von IL-6 im Vergleich zur alleinigen LPS-Gabe (§§§ $P < 0,001$).

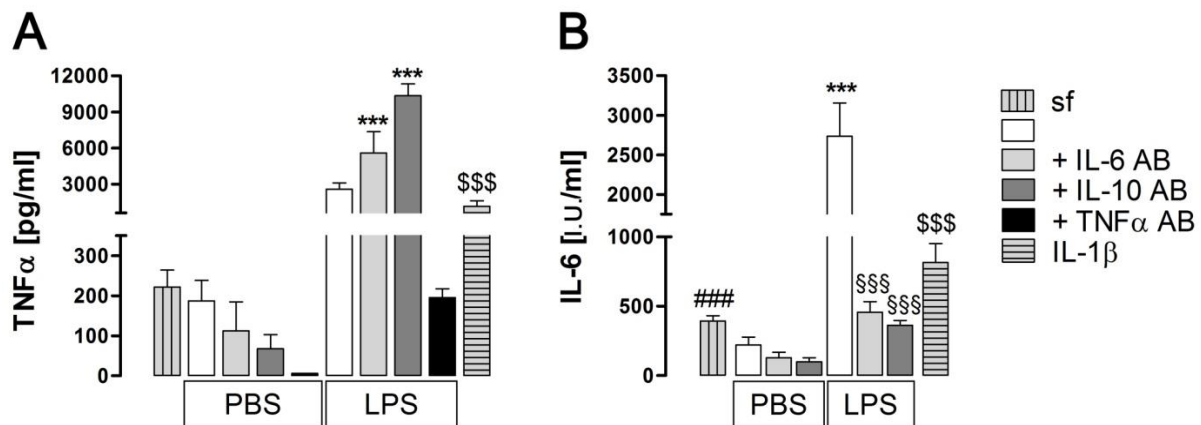


Abbildung 14-2

Gehalte an bioaktivem TNF- α (A) bzw. IL-6 (B) zum Zeitpunkt 6 h nach Stimulation der Zellen mit LPS (100 μ g/ml) bzw. PBS als Kontrolle und Vorbehandlung mit Zytokinantikörpern (IL-6-, IL-10- und TNF- α -Antikörper; AB, 1 μ l/ml).

Versuchsgruppen: Ausschließliche Inkubation mit serumfreiem Medium (sf 24 h), 30-minütige Vorinkubation mit einem Antikörper (+IL-6 AB, +IL-10 AB, +TNF- α AB, jeweils 1 μ l/ml) und Stimulation mit LPS oder PBS für 6 h oder ausschließliche Inkubation mit LPS oder PBS als Kontrolle (weißer Balken) für 6 h oder Stimulation mit IL-1 β für 6 h.

TNF- α -Konzentration im Überstand: * Vergleich PBS+IL-6 AB mit LPS+IL-6 AB bzw. PBS+IL-10 AB mit LPS+IL-10 AB: *** $P < 0,001$; \$ Vergleich IL-1 β mit LPS+ IL-6 AB bzw. LPS+ IL-10 AB: \$\$\$ $P < 0,001$

IL-6-Konzentration im Überstand: * Vergleich LPS mit PBS: *** $P < 0,001$; # Vergleich sf mit LPS: ### $P < 0,001$; \$ Vergleich IL-1 β mit LPS: \$\$\$ $P < 0,001$; § Vergleich LPS mit LPS+IL-6 AB bzw. LPS+IL-10 AB: §§§ $P < 0,001$

14.2. Charakterisierung der NF-IL6- und TNF- α -Immunreaktivität nach LPS-Stimulation

Die Anzahl, Intensität und Verteilung der NF-IL6-Signale sowie das Vorhandensein des Zytokins TNF- α im sog. Transgolgi-Apparat der Zelle wurde anhand immunzytochemischer Untersuchungen genauer analysiert. Die ausschließliche Stimulation der Zellen mit 100 μ g/ml LPS führte im Vergleich zur Kontrollsubstanz PBS in jedem Fall zu einer Erhöhung der Anzahl und der Intensität der NF-IL6-Signale (in Rot markiert; Abbildung 14-3, A und B). Die zusätzliche Vorinkubation für 30 Minuten mit dem IL-6- bzw. dem IL-10-Antikörper und darauffolgende Stimulation mit LPS führte zusätzlich zu einer gesteigerten Anzahl und Intensität der Signale (Abbildung 14-3, C, D, E und F). Des Weiteren war die Immunreaktivität für TNF- α (in Grün) in den NF-IL6-immunreaktiven Zellen nach LPS-Stimulation deutlich erkennbar. Das heißt, dass im HVL NF-IL6-positive Zellen auch TNF- α exprimieren können. Nach der vorherigen Inkubation der HVL-Zellen mit dem TNF- α -Antikörper und anschließender LPS-Stimulation war eine minimal erhöhte Anzahl an NF-IL6-Signalen, aber keine TNF- α -positive Zelle detektierbar (Abbildung 14-3, G und I).

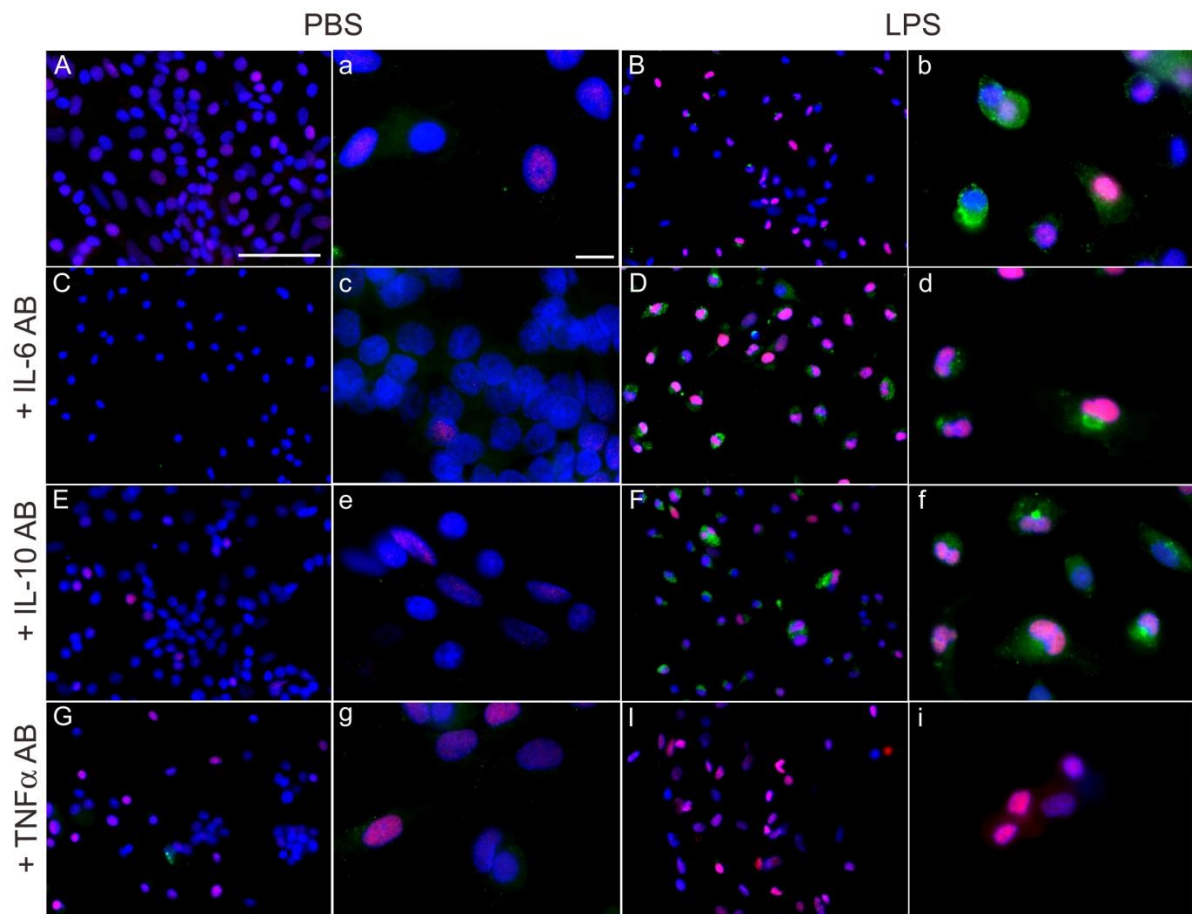


Abbildung 14-3

NF-IL6-Immunreaktivität (Rot) und Produktion von TNF- α (Grün) in den Zellen einer primären Zellkultur des HVL 6 h nach Stimulation mit LPS (100 $\mu\text{g/ml}$) oder PBS als Kontrollsubstanz. Je nach Versuchsgruppe wurden die Zellen zusätzlich vor der Stimulation mit LPS (bzw. PBS) 30 Minuten mit einem Zytokinantikörper (AB, jeweils 1 $\mu\text{l/ml}$) inkubiert. In den mit Großbuchstaben gekennzeichneten Übersichtsbildern (A-I) ist ein Ausschnitt aus der jeweiligen primären Zellkultur zu sehen, welcher dann in den mit Kleinbuchstaben gekennzeichneten Detailaufnahmen (a-i) vergrößert dargestellt wurde. In allen Aufnahmen sind die Zellkerne im blauen Kanal dargestellt (DAPI-Kernfärbung). Der Größenmarker entspricht in A-G 50 μm und in allen Detailaufnahmen a-i 10 μm .

Nach der Stimulation der Zellen mit LPS (B, b) zeigte sich eine deutliche Zunahme der Intensität und Anzahl der NF-IL6-Signale im Vergleich zur Kontrolle mit PBS (A, a). Nach Vorinkubation mit dem IL-6-Antikörper bzw. dem IL-10-Antikörper und einer Stimulation mit LPS (D, d bzw. F, f) ist eine Produktion des Zytokins TNF- α (in Grün) in dem sog. Transgolgi-Apparat der Zelle detektierbar.

qualitative analysis of the immunoreactivity in the primary cell culture of the anterior pituitary								
	PBS				LPS			
		+IL-6 AB	+IL-10 AB	+TNF- α AB		+IL-6 AB	+IL-10 AB	+TNF- α AB
NF-IL6	+	+	+	+	++	+++	+++	++
	(2,7)	(2,6)	(2,6)	(2,8)	(4,4)	(4,9)	(5,0)	(3,9)
TNF-α	\pm (2,4)	\pm (2,3)	\pm (2,4)	-	+	++	+++	-
				(1,0)	(3,3)	(4,2)	(4,9)	(1,0)
ACTH	+	+	++	+	++	+	++	\pm (2,1)
	(3,1)	(3,0)	(3,7)	(3,1)	(4,0)	(3,3)	(4,2)	

Tabelle 14-1

Semiquantitative Analyse der Anzahl nukleärer NF-IL6-Signale, TNF- α -immunreaktiver und ACTH-immunreaktiver Zellen in der primären Zellkultur des HVL.

Eine Bewertung der relativen Dichte an Signalen wurde anhand eines Fünfpunkteschemas (siehe Kapitel 9.1.4) vollzogen und für jede Versuchsgruppe gemittelt: +++ (5) = hohe Dichte, ++ (4) = mittlere bis moderate Dichte, + (3) = niedrige Dichte, \pm (2) = einzelne Signale in einigen Fällen, - (1) = keine Signale.

Die zusätzliche Vorinkubation für 30 Minuten mit dem IL-6-, IL-10- oder TNF- α -Antikörper und darauffolgende Stimulation mit der Kontrollsubstanz PBS führte zu keiner Veränderung bei der Anzahl der NF-IL6-Signale. Die Verwendung des TNF- α -Antikörpers reduzierte die Anzahl der TNF- α -positiven Zellen sowohl nach PBS als auch nach LPS-Stimulation stark. Die Anzahl der ACTH-positiven Zellen konnte durch die Vorinkubation mit dem IL-10-Antikörper vor PBS-Stimulation erhöht werden. Die Stimulation der Zellen mit 100 μ g/ml LPS führte im Vergleich zur Kontrollsubstanz (PBS) in jedem Fall zu einer Erhöhung der Anzahl und der Intensität der NF-IL6-Signale und konnte durch die Vorinkubation mit dem IL-6- bzw. IL-10-Antikörper gesteigert werden. Die Anzahl der TNF- α -positiven Zellen erhöhte sich durch die Vorinkubation mit IL-6- bzw. IL-10-Antikörper und anschließender LPS-Stimulation. Die Anzahl der ACTH-positiven Zellen lässt sich durch die Vorinkubation mit dem IL-10-Antikörper steigern bzw. durch die Vorinkubation mit dem IL-6- und dem TNF- α -Antikörper reduzieren.

14.2.1. Immunzytochemische Charakterisierung von follikulostellaten Zellen als möglicher Zellphänotyp für die TNF- α - und IL-6-Produktion

Um die potenzielle Rolle und Bedeutung des HVL in der Produktion von Zytokinen und deren Einfluss auf die Produktion und Freisetzung von Hormonen wie ACTH während systemischer Entzündungsreaktionen untersuchen zu können, erfolgte eine immunzytochemische Färbung der follikulostellaten Zellen des HVL. In den für diese Arbeit untersuchten primären Kulturen des HVL konnten S100 Protein-positiv follikulostellaten Zellen detektiert werden, welche 6 h nach der Stimulation der Zellkultur mit LPS (100 μ g/ml) eine TNF- α -Immunreaktivität zeigten (Abbildung 14-4, Bb).

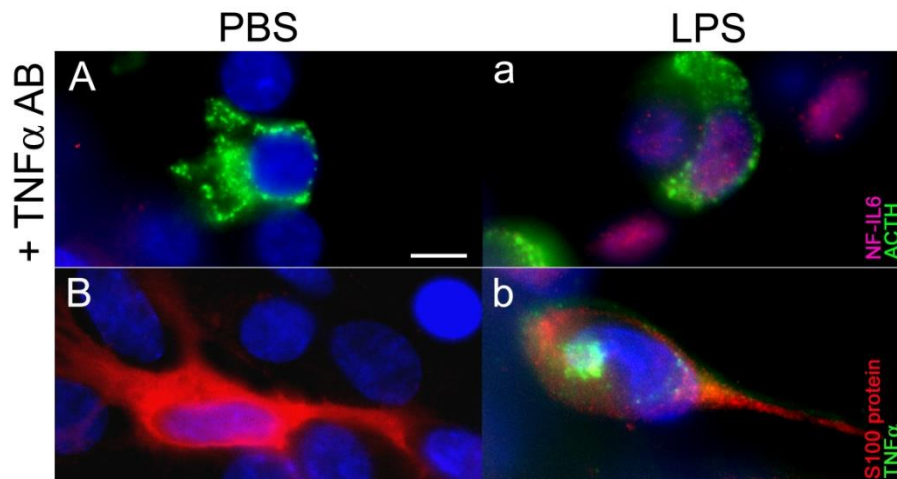


Abbildung 14-4

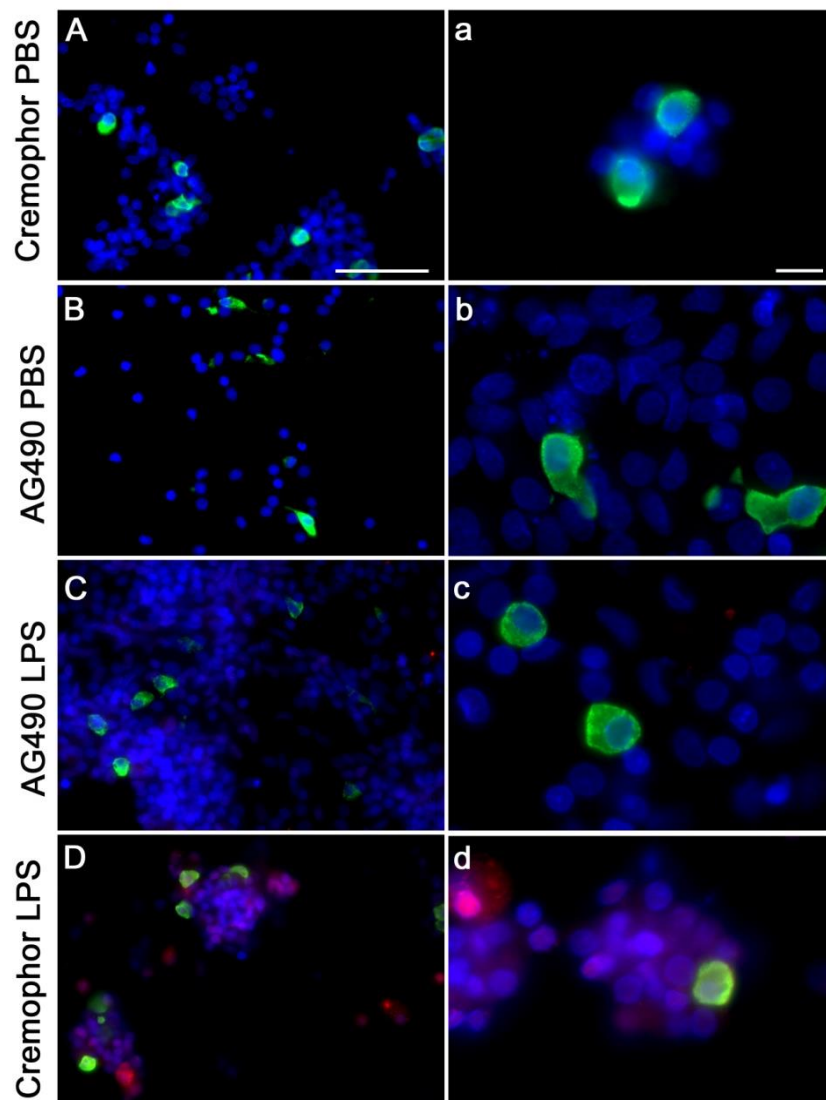
(A,a) NF-IL6-Immunreaktivität (in Rot) und Colokalisation mit ACTH-positiven Zellen (Grün) 6 h nach LPS-Stimulation (100 µg/ml) bzw. PBS-Kontrolle und vorheriger 30-minütiger Inkubation mit einem TNF- α -Antikörper (TNF- α -AB).

(B,b) S100 Protein-positive follikulostellare Zellen (FS-Zellen) (Rot) 6 h nach der Stimulation der Zellen der HVL-Zellkultur mit LPS (100 µg/ml) bzw. PBS. Die positive Zelle zeigte nach Stimulation mit LPS eine Colokalisation mit TNF- α (in Grün), was auf eine mögliche Produktion dieses Zytokins durch die FS-Zellen hindeutet.

In allen Aufnahmen sind die Zellkerne im blauen Kanal dargestellt (DAPI-Kernfärbung) und der Größenmarker entspricht 10 µm.

14.2.2. Einfluss des JAK-STAT-Inhibitors AG490 auf die NF-IL6- und ACTH-Immunreaktivität in LPS-stimulierten HVL-Zellen

Um die mögliche Beteiligung des Janus-Kinase-Signalweges bei der Aktivierung von NF-IL6 und der ACTH-Produktion in der Hypophyse und somit bei LPS-induzierten Entzündungsreaktionen in der HPA-Achse zu untersuchen, wurden die Zellen der HVL-Kultur vor der Stimulation mit LPS bzw. PBS mit dem JAK-STAT-Inhibitor AG490 bzw. seinem Lösungsmittel Cremophor für 30 Minuten inkubiert. Die darauffolgende immunzytochemische Untersuchung erfolgte 6 h nach LPS- bzw. PBS-Stimulation. Die untersuchten Kulturen, die mit AG490 vorinkubiert und mit PBS (AG490-PBS) stimuliert wurden, zeigten keinerlei Unterschiede zu den mit Cremophor und PBS (Cremophor-PBS) behandelten Kulturen (Abbildung 14-5, Aa und Bb). Es konnten weder NF-IL6-Signale noch eine Veränderung der Anzahl an ACTH-positiven Zellen festgestellt werden. Die stärksten Unterschiede waren zwischen den mit Cremophor-LPS und den AG490-LPS stimulierten Zellen zu beobachten, da AG490 einen Teil der NF-IL6-Signale unterdrückte (Abbildung 14-5 Cc und Dd). Des Weiteren erschien die Anzahl der ACTH-positiven Zellen reduziert. Die Gesamtzahl an Zellen war allerdings nicht signifikant beeinflusst. Die Messung von TNF- α im Überstand der behandelten Zellkulturen zeigte nach PBS-Behandlung und Vorinkubation mit Cremophor bzw. AG490 keinen nennenswerten Anstieg der TNF- α -Konzentration. Die LPS-Stimulation hingegen resultierte nach Vorinkubation mit Cremophor in einem starken Anstieg der TNF- α -Konzentration. Wohingegen die AG490-Behandlung



Einfluss des Inhibitors AG490 bzw. seines Lösungsmittels Cremophor auf die NF-IL6- bzw. ACTH- Immunreaktivität der HVL-Zellen 6 h nach der Stimulation mit LPS (100 µg/ml) oder PBS als Kontrollsubstanz. Eine vorherige Behandlung mit AG490 führte teilweise zu einer Abschwächung des NF-IL6-Signals (Rot). Die Anzahl der ACTH-positiven Zellen (in Grün) erschien reduziert. Es konnten keine Colokalisationen zwischen NF-IL6-Signalen und ACTH-positiven Zellen detektiert werden.

In allen Aufnahmen sind die Zellkerne im blauen Kanal dargestellt (DAPI-Kernfärbung) und der Größenmarker entspricht in den Übersichtsaufnahmen (A-D) 50 μm und in den Detailaufnahmen (a-d) 10 μm .

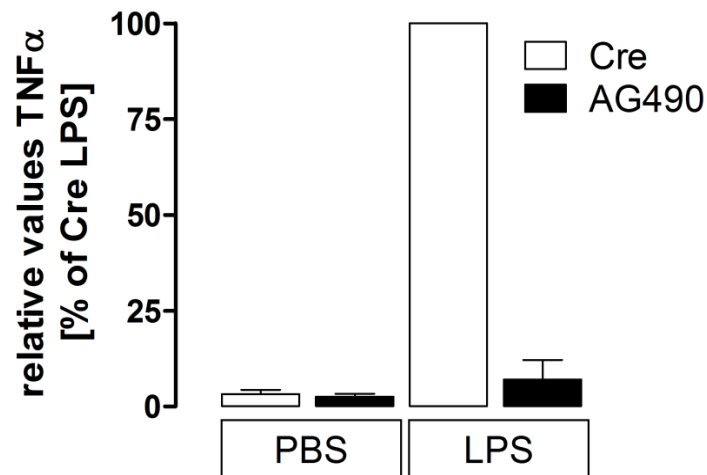


Abbildung 14-6

Die relative TNF- α -Konzentration (Zellkulturüberstände) in den mit PBS bzw. LPS stimulierten und mit Cremophor bzw. AG490 vorinkubierten primären Zellkulturen des HVL im Verhältnis zu allen mit LPS stimulierten und mit Cremophor inkubierten Zellkulturen. Der stimulierende Eigeneffekt von LPS in Kombination mit dem Lösungsmittels Cremophor sowie der stark hemmende Einfluss des JAK-STAT-Inhibitors AG490 auf die LPS-induzierte TNF- α -Produktion sind deutlich zu erkennen.

Es wurden 3 unabhängige Versuche mit jeweils 2-3 Wells durchgeführt.

14.3. Charakterisierung der ACTH-Immunreaktivität nach LPS-Stimulation

Nach der Stimulation der HVL-Zellen mit LPS (100 μ g/ml) bzw. der Kontrollsubstanz PBS wurde immunzytochemisch untersucht, ob es zu einem Anstieg oder Abfall der Anzahl der ACTH-positiven Zellen kommt. Damit sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen der Aktivierung von NF-IL6 und der ACTH-Produktion in der Hypophyse weitergehend betrachtet werden. Generell lag 6 h nach der Inkubation der Zellen mit LPS im Vergleich zu PBS eine erhöhte Anzahl an ACTH-positiven Zellen (in Grün) vor. Vor allem in Bereichen mit größeren Zellansammlungen oder Zellhaufen konnten viele ACTH-positive Zellen detektiert werden. Die zusätzliche, vorausgehende Inkubation der Zellen mit einem der Zytokin-Antikörper führte im Fall des IL-6-Antikörpers zu einer deutlichen Abnahme und im Fall des IL-10-Antikörpers zu einer Zunahme der Anzahl der ACTH-positiven Zellen (Abbildung 14-7, A-C). In weiteren Untersuchungen wurde gezeigt, dass 6 h nach Behandlung mit LPS und nach vorangegangener Inkubation mit einem TNF- α -Antikörper, NF-IL6-Signale in ACTH-positiven Zellen detektierbar waren (Abbildung 14-4, A, a).

Durch die Auszählung der ACTH-positiven Zellen jeder untersuchten Zellkultur der jeweiligen Behandlungsgruppe ergaben sich weitere Ergebnisse. Es konnte gezeigt werden, dass die Stimulation der Zellen des HVL mit LPS im Vergleich zur Stimulation mit PBS zu einer Zunahme der Anzahl der ACTH-immunreaktiven Zellen führte. Durch die Verwendung des TNF- α -Antikörpers konnte kein deutlicher Unterschied hervorgerufen werden. Allerdings zeigte sich nach Vorinkubation mit dem IL-6-Antikörper sowohl nach PBS als auch nach LPS-Stimulation eine Erniedrigung der Anzahl ACTH-positiver Zellen. Ein signifikanter Unterschied konnte ausschließlich nach Verwendung des IL-10-Antikörpers und

anschließender LPS-Stimulation erreicht werden, da dies zu einem signifikanten Anstieg der Anzahl der ACTH-positiven Zellen führte (Abbildung 14-8). Insgesamt konnten von ungefähr 500 ausgezählten Zellen pro untersuchte Zellkultur je nach Behandlung zwischen 3 und 14% ACTH-positive Zellen detektiert werden. Zur graphischen Darstellung und für den statistischen Vergleich der Anzahl der ACTH-positiven Zellen nach den unterschiedlichen Behandlungen, wurden die Mittelwerte (\pm Standardfehler) aller ausgezählten Zellkulturen verwendet. Anhand eines Statistikprogramms (Prism®) wurde eine einfaktorielle ANOVA mit nachfolgendem Newman-Keuls post-hoc Test durchgeführt. Für signifikante Unterschiede wurde auch hier eine Irrtumswahrscheinlichkeit $P < 0,05$ festgelegt.

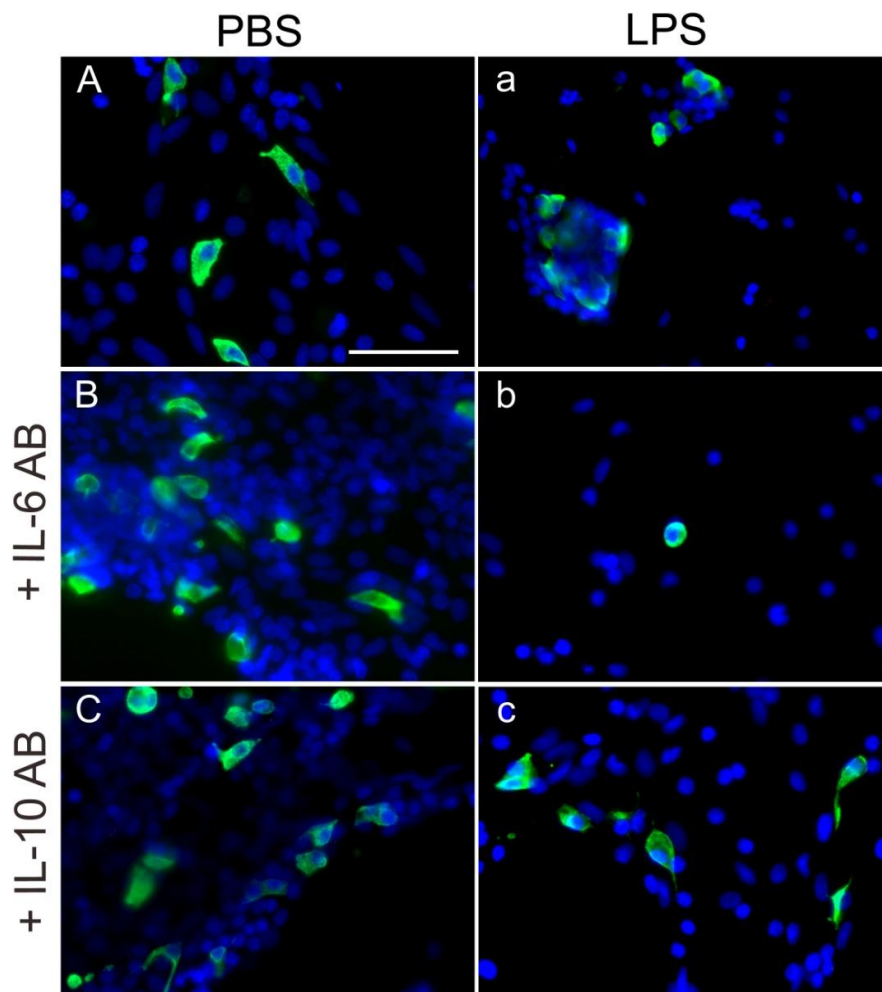


Abbildung 14-7

ACTH-Immunreaktivität (Grün) der HVL-Zellen 6 h nach Stimulation mit LPS (100 $\mu\text{g/ml}$, A-C) oder PBS (a-c) als Kontrollsubstanz. Zusätzlich wurden die Zellen z.T. vor der Stimulation mit LPS bzw. PBS 30 Minuten mit einem Zytokinantikörper (IL-6 AB bzw. IL-10 AB) inkubiert. In allen Aufnahmen sind die Zellkerne im blauen Kanal dargestellt (DAPI-Kernfärbung). Der Größenmarker aus A entspricht 50 μm und gilt für alle Aufnahmen (A-C und a-c).

In allen Fällen führte eine Stimulation der HVL-Zellen mit LPS zu einer Zunahme der Anzahl der ACTH-positiven Zellen im Vergleich zur Kontrolle mit PBS. Die zusätzliche Inkubation mit einem IL-6-Antikörper und anschließender LPS-Stimulation führte hingegen zu einer deutlichen Reduktion der ACTH-positiven Zellen. Die Inkubation mit einem IL-10-Antikörper bewirkte nach LPS-Gabe eine erhöhte Anzahl an ACTH-positiven Zellen.

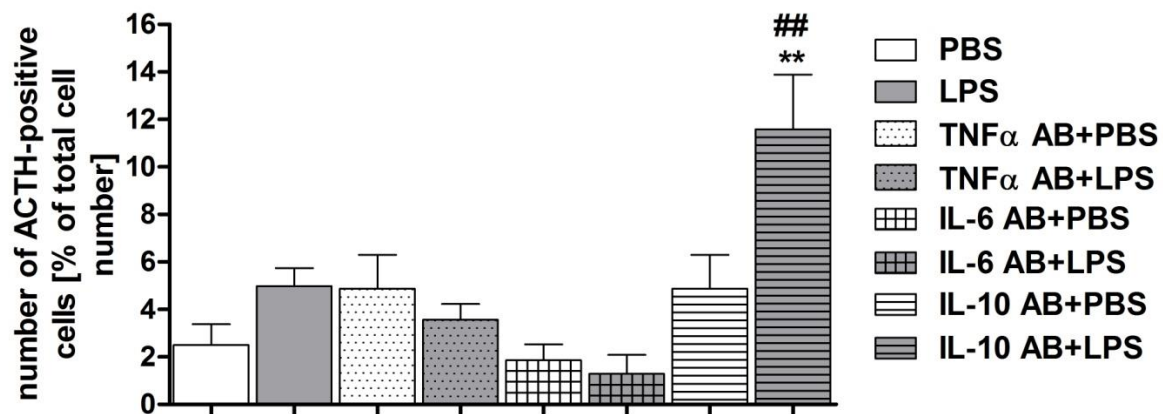


Abbildung 14-8

Darstellung der Anzahl der ACTH-positiven Zellen in Prozent im Vergleich zur Gesamtzellzahl für die jeweilige Behandlung mit PBS oder LPS und der vorangegangenen Inkubation mit einem Zytokinantikörper (TNF- α AB, IL-6 AB oder IL-10 AB).

Die Stimulation mit LPS resultierte im Vergleich zu PBS in einer Zunahme der ACTH-positiven Zellen. Durch die Verwendung des TNF- α -Antikörpers konnte kein deutlicher Unterschied hervorgerufen werden. Allerdings zeigte sich nach Vorinkubation mit dem IL-6-Antikörper sowohl nach PBS als auch nach LPS-Stimulation eine Erniedrigung der Anzahl ACTH-positiver Zellen. Ein signifikanter Unterschied konnte allerdings ausschließlich nach Verwendung des IL-10-Antikörpers und anschließender LPS-Stimulation erreicht werden.

Im Vergleich zur Stimulation mit LPS: ** $P < 0,01$

Im Vergleich zur Stimulation mit PBS und der Vorinkubation mit dem IL-10 AB: ## $P < 0,01$

14.3.1. Charakterisierung der NF-IL6- und ACTH-Immunreaktivität in IL-1 β -stimulierten HVL-Zellen

Das proinflammatorische Zytokin IL-1 β (1 μ l/ml) wurde in der primären Zellkultur des HVL als eine Positivkontrolle genutzt und wirkte ähnlich stimulierend auf die kultivierten Zellen der Hypophyse wie die Inkubation mit 100 μ g/ml LPS. Das heißt, dass es nach Stimulation der HVL-Zellen mit IL-1 β zu einer Erhöhung der Anzahl und Intensität der NF-IL6-Signale kam und teilweise Colokalisationen mit TNF- α im Bereich des Transgolgi-Apparates der Zelle beobachtet werden konnten. Des Weiteren führte die Inkubation mit IL- β im Vergleich zu Kontrollkulturen (PBS) zu einer erhöhten Anzahl an ACTH-positiven Zellen (Abbildung 14-9).

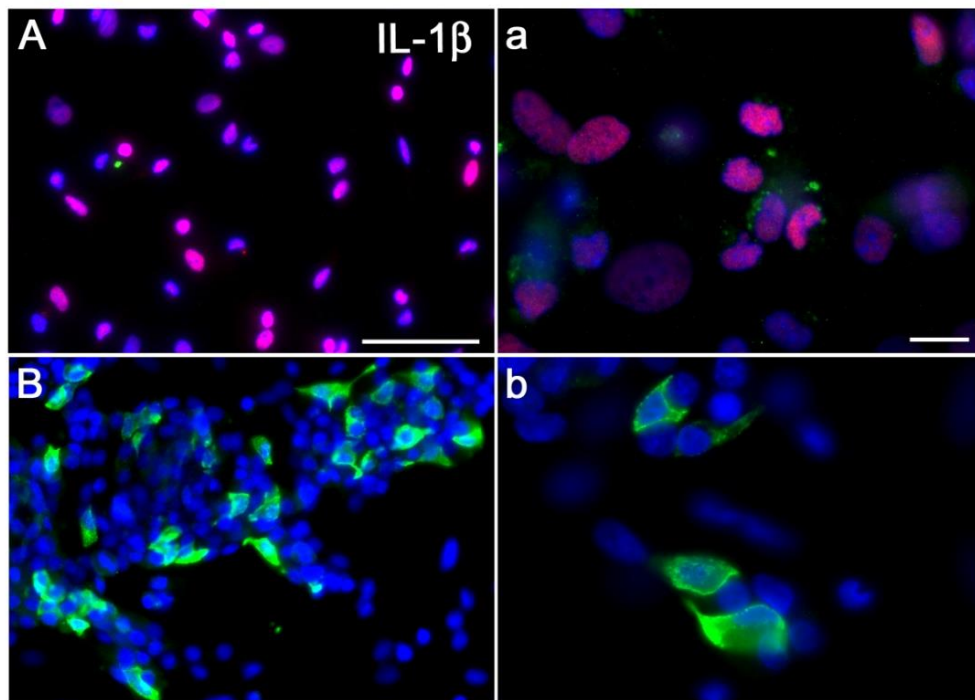


Abbildung 14-9

(A) NF-IL6- bzw. (B) ACTH-Immunreaktivität der HVL-Zellen 6 h nach der Inkubation mit dem Zytokin IL-1 β .

In allen Aufnahmen sind die Zellkerne im blauen Kanal dargestellt (DAPI-Kernfärbung) und der Größenmarker entspricht in den Übersichtsaufnahmen (A und B) 50 μ m und in den Detailaufnahmen (a und b) 10 μ m.

Die Inkubation mit IL-1 β führte zu einer gesteigerten Anzahl an NF-IL6-positiven Zellen (A, a), welche teilweise mit TNF- α colokalisierten und zum anderen zu einer erhöhten Anzahl an ACTH-positiven Zellen (B, b).

15. Charakterisierung von veränderten, physiologischen Parametern im Verlauf LPS-induzierter Entzündungsreaktionen bei homozygoten, NF-IL6-defizienten Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Geschwistern

15.1. Veränderungen der physiologischen Parameter in Abhängigkeit von zwei verschiedenen, systemisch verabreichten LPS-Dosen

15.1.1. Körperkerntemperatur

15.1.1.1. Vergleich der verschiedenen Behandlungen innerhalb eines Genotyps

Die Wildtyp- und NF-IL6-Knock-out-Mäuse erhielten entweder eine Injektion mit physiologischer Kochsalzlösung (NaCl oder Saline) als Kontrolle oder 50 µg/kg bzw. 2,5 mg/kg KGW LPS. Alle durchgeführten Injektionen erfolgten zum Zeitpunkt $t = 0$ und i.p.. Die abdominale Körperkerntemperatur wurde in allen Gruppen vom Zeitpunkt $t = -2$ h (-120 Minuten) bis zum Ende des Versuches nach 24 h (1440 Minuten) aufgezeichnet. Bei der Beurteilung der Ergebnisse wurden die verschiedenen Dosierungen und die unterschiedlichen Genotypen der Mäuse untereinander verglichen. Generell zeigten alle Mäuse eine kurze und stressbedingte Erhöhung der Körperkerntemperatur („Stresspeak“) nach Fixation und der i.p. Injektion (Abbildung 15-1 und Abbildung 15-2). Im Versuchszeitraum von 24 h lag die durchschnittliche Körperkerntemperatur der Wildtyp-Tiere bei $\sim 37,33 \pm 0,17$ °C und die der Knock-out-Mäuse bei $\sim 37,19 \pm 0,24$ °C. Die i.p. Injektion der physiologischen Kochsalzlösung in den Kontrollgruppen der Wildtyp- und NF-IL6-Knock-out-Mäuse ergab keine signifikanten Abweichungen von der Durchschnittstemperatur. Der circadiane Rhythmus schien sowohl bei den Wildtypen- als auch bei den Knock-out-Tieren durch die Versuchsbedingungen nicht beeinflusst zu werden. In der Nacht (Dunkelphase in der Klimakammer) erfolgte ein Anstieg der Körperkerntemperatur um durchschnittlich 0,6 °C (Abbildung 15-2, A).

Wildtyp-Mäuse: nach Injektion der niedrigen Dosis von 50 µg/kg KGW LPS kam es nach 75 Minuten zu einem signifikanten Temperaturanstieg auf 38,32°C (NaCl Versuchsgruppe: 37,37°C) bis hin zu maximalen Werten von 38,45°C nach 1,75 h (NaCl Versuchsgruppe: 36,79°C). Gegen Ende des 24-stündigen Versuchszeitraumes hatten sich die Körperkerntemperaturen beider Versuchsgruppen (LPS, NaCl) wieder aneinander angeglichen (Abbildung 15-1, A). Nach der i.p. Injektion der hohen Dosis von 2,5 mg/kg KGW LPS entwickelte sich bei den Wildtyp-Mäusen ein 24 h (Maximum innerhalb der ersten 8 h) andauerndes Fieber, welches auch über die Dunkelphase nur unwesentlich niedriger wurde und somit den circadianen Rhythmus beeinflusste. Auch nach 24 h hatten sich die Temperaturen der beiden Versuchsgruppen noch nicht aneinander angeglichen (Abbildung 15-1, B).

NF-IL6-Knock-out-Mäuse: nach Injektion der niedrigen Dosis von 50 µg/kg KGW LPS kam es bei den Knock-out-Mäusen nach 1,25 h zu einem signifikanten Temperaturanstieg auf 38,74°C (NaCl Kontrollgruppe: 37,21°C). Noch vor der Dunkelphase und somit aktiven

Phase der Tiere glichen sich die Körperkerntemperaturen der beiden Versuchsgruppen wieder aneinander an und die circadiane Rhythmik blieb erhalten. Gegen Ende des 24-stündigen Versuchszeitraumes entwickelte sich bei den LPS-injizierten Versuchstieren erneut eine Erhöhung der Temperatur auf 38,39°C nach 21,5 h bzw. 37,34°C nach 23,5 h (NaCl-Versuchsgruppe: 36,73°C nach 23,5 h) (Abbildung 15-1, C). Nach der i.p. Injektion der hohen Dosis von 2,5 mg/kg KGW LPS entwickelte sich bei den NF-IL6-Knock-out-Mäusen weder eine initiale Hypothermie noch ein regelrechtes Fieber. Nach 8 h entwickelte sich eine in etwa gleichbleibende Temperatur von 37,68°C, die bis zur Beendigung des Versuchszeitraumes anhielt. In der Dunkelphase war keine circadiane Rhythmik zu erkennen (Abbildung 15-1, D).

15.1.1.2. Zusammenfassende Darstellung des Temperaturverlaufs über 24h

Wildtyp-Mäuse	Minimale Temperatur	Maximale Temperatur	Fieberdauer
NaCl-Injektion (n=20)	36,41 ± 0,1°C (bei t= 4,25 h)	38,75 ± 0,1°C (bei t= 10,25 h)	nur Stresspeak
50 µg/kg KGW LPS-Injektion (n=6)	36,98 ± 0,1°C (bei t= 7,25 h)	38,45 ± 0,2°C (bei t= 1,75 h)	t= 0,5 bis t= 7 h
2,5 mg/kg KGW LPS-Injektion (n=12)	37,06 ± 0,3°C (bei t= -2h)	38,36 ± 0,3°C (bei t=2,5 h)	t= 1 bis t= 24 h
NF-IL6-Knock-out-Mäuse	Minimale Temperatur	Maximale Temperatur	Fieberdauer
NaCl-Injektion (n=12)	36,11 ± 0,3°C (bei t= 4 h)	38,39 ± 0,1°C (bei t= 20,75 h)	nur Stresspeak
50 µg/kg KGW LPS-Injektion (n=4)	36,80 ± 0,4°C (bei t= 6,5 h)	38,74 ± 0,1°C (bei t= 1,25 h)	t= 1,5 bis t= 4 h und t= 20,5 bis t= 23,5 h
2,5 mg/kg KGW LPS-Injektion (n=8)	36,67 ± 0,3°C (bei t= -1 h)	38,01 ± 0,2°C (bei t= 23 h)	t= 8 bis 24 h

Tabelle 15-1

Zusammenfassende Darstellung des Temperaturverlaufs über 24h.

Vergleich zwischen den unterschiedlichen LPS-Dosen und der Kontrolle (NaCl, 50 µg/kg KGW LPS oder 2,5 mg/kg KGW LPS) innerhalb eines Genotyps (Wildtyp- vs. Knock-out-Maus).

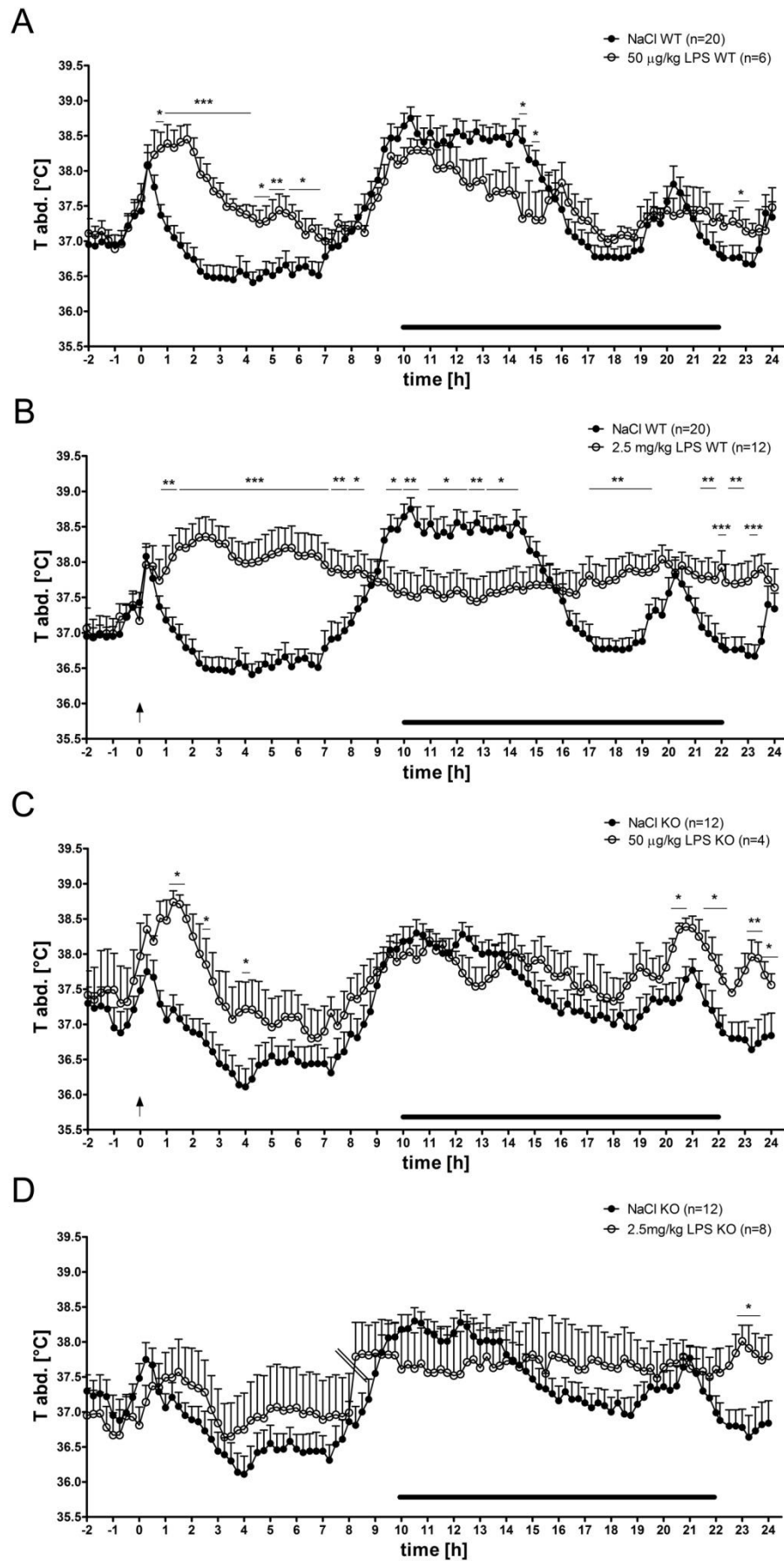


Abbildung 15-1

Verlauf der intraabdominal gemessenen Körperkerntemperatur innerhalb von 24 h nach der Injektion von 50 µg/kg bzw. 2,5 mg/kg KGW LPS oder NaCl als Kontrollsubstanz. Gegenüberstellung der Temperaturverläufe von Wildtyp-Mäusen und NF-IL6-Knock-out-Mäusen innerhalb ihrer eigenen Versuchsgruppen. Der Zeitpunkt der i.p. Injektion wurde mit einem Pfeil markiert. Des Weiteren ist die Dunkelphase mit einer schwarzen Linie gekennzeichnet. Die Tierzahlen für die jeweilige Gruppe wurden hinter der Behandlung hinzugefügt, wobei beachtet werden muss, dass für n=12 bei 2,5 mg/kg LPS WT sowohl die 8 h als auch die 24 h Tiere berücksichtigt wurden.

* $P<0,05$, ** $P<0,01$ und *** $P<0,001$: Vergleich zwischen der NaCl-Injektion und der Injektion von 50 µg/kg bzw. 2,5 mg/kg KGW LPS jeweils für die Gruppe „Wildtyp-Maus“ und „NF-IL6-Knock-out-Maus“.

15.1.1.3. Vergleich der beiden Genotypen „Wildtyp“ und „NF-IL6-Knock-out“ innerhalb einer Behandlungsgruppe

Nach der Injektion von physiologischer Kochsalzlösung war nach 7,75 h ein erster signifikanter Unterschied zwischen beiden Genotypen zu erkennen (Abbildung 15-2, A). Die Erhöhung der Basistemperatur erfolgte bei den Wildtyp-Mäusen durchschnittlich bei einer höheren Körperkerntemperatur. Signifikante Unterschiede hinsichtlich der Körperkerntemperatur beider Genotypen waren in der Nacht und somit in der Aktivitätsphase der Mäuse zu verzeichnen (WT: 38,55°C und KO: 37,74 bei $t=14,75$ h bzw. WT: 38,11°C und KO: 37,47°C bei $t=15,5$ h). Die erhöhte Körperkerntemperatur der Wildtyp-Mäuse spiegelte sich bei genauer Betrachtung auch in der Aktivität der Mäuse wider, da die Wildtypen sich prinzipiell über den Versuchszeitraum von 24 h und im Speziellen während der Nachtphase mehr bewegten (siehe Kapitel 15.1.2). Gegen Ende dieser Phase und somit zu Beginn der Ruhephase der Tiere hatten sich die Temperaturen der beiden Genotypen wieder aneinander angeglichen. Nach der Injektion der niedrigen Dosis von 50 µg/kg KGW LPS waren bis zum Ende der Dunkelphase fast keine signifikanten Unterschiede zwischen den Wildtyp-Mäusen und den Knock-out-Mäusen festzustellen (Abbildung 15-2). Beide Tiergruppen entwickelten Fieber, allerdings von unterschiedlicher Dauer (Abbildung 15-1). Die Wildtyp-Tiere zeigten ein 4-stündiges Fieber ($t=0,5$ - 4,5 h). Dagegen konnte bei den Knock-out-Mäusen nur über einen Zeitraum von 3 Stunden ($t=0,5$ - 3,5 h) eine erhöhte Körperkerntemperatur verzeichnet werden, die aber gegen Ende des Versuchszeitraumes ($t=20,5$ h) nochmals für 2 h anstieg. Zu Beginn der Dunkelphase kam es zu einem physiologischen Anstieg der Körperkerntemperatur in Korrelation mit der erhöhten körperlichen Aktivität (siehe Kapitel 15.1.2.). Knock-out-Mäuse zeigten am Ende des Versuchszeitraumes zwei signifikante Erhöhungen der Körperkerntemperatur im Vergleich zu den Wildtypen (WT: 37,39°C und KO: 38,39°C bei $t=20$ -22 h bzw. WT: 37,14°C und KO: 37,94°C bei $t=24$ h) (Abbildung 15-2, B). Der circadiane Rhythmus schien bei beiden Gruppen unbeeinflusst.

Nach der i.p. Injektion der hohen Dosis von 2,5 mg/kg KGW LPS zeigten sich im gesamten Versuchszeitraum von 24 h keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen. Allerdings unterschieden sich die Körperkerntemperaturen der beiden Versuchsgruppen innerhalb der ersten 8 h (n=12) (Abbildung 15-2, C). Die NF-IL6-Knock-out-Mäuse zeigten zwar den durch die LPS-Injektion ausgelösten Stresspeak, allerdings war ihre

Körperkerntemperatur im Gegensatz zu den Wildtyp-Mäusen und im Vergleich zu den NaCl-stimulierten Kontrolltieren nicht signifikant erhöht (Abbildung 15-1). Ab 9 h nach der Injektion glichen sich die Temperaturen beider Genotypen (2,5 mg/kg KGW LPS) weiter aneinander an und blieben auf einem etwa gleichen Niveau bis zum Ende des Versuchszeitraumes von 24 h (Durchschnittstemperatur WT: 37,69°C und KO: 37,68°C bei t= 9-24 h).

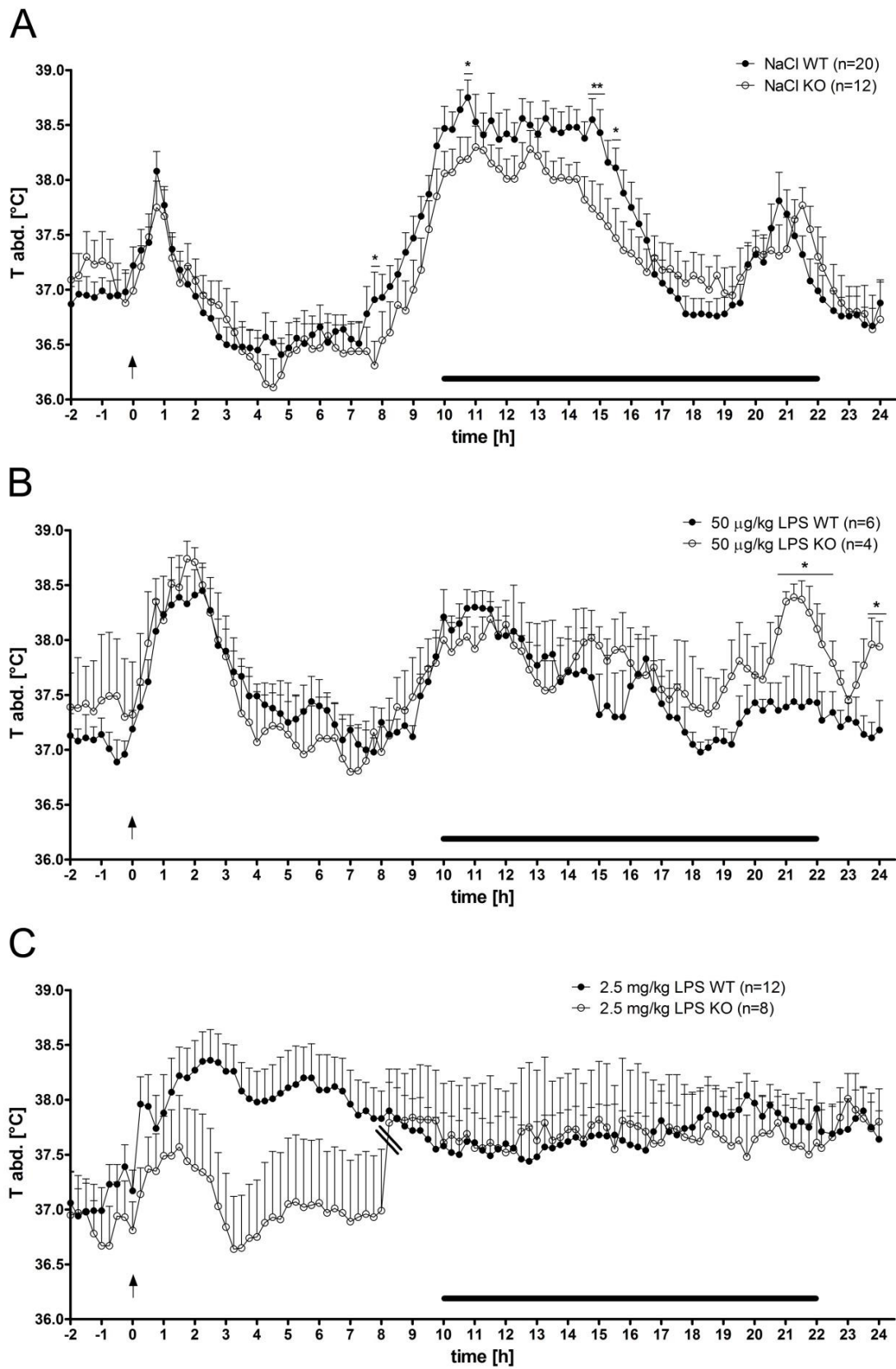


Abbildung 15-2

Verlauf der intraabdominal gemessenen Körperkerntemperatur innerhalb von 24 h nach der Injektion von 50 µg/kg bzw. 2,5 mg/kg KGW LPS oder NaCl als Kontrollsubstanz. Gegenüberstellung der Temperaturverläufe von Wildtyp-Mäusen und NF-IL6-Knock-out-Mäusen mit der gleichen Behandlung. Der Zeitpunkt der i.p. Injektion wurde mit einem Pfeil markiert. Des Weiteren ist die Dunkelphase mit einer schwarzen Linie gekennzeichnet. Die Tierzahlen für die jeweilige Gruppe wurden hinter der Behandlung hinzugefügt, wobei beachtet werden muss, dass für n=12 bei 2,5 mg/kg LPS WT sowohl die 8 h als auch die 24 h Tiere berücksichtigt wurden.

* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ und *** $P < 0,001$: Vergleich zwischen dem Genotyp „Wildtyp-Maus“ und „NF-IL6-Knock-out-Maus“ innerhalb einer Behandlungsgruppe (NaCl-Injektion als Kontrolle oder Injektion von 50 µg/kg bzw. 2,5 mg/kg KGW LPS).

15.1.2. Lokomotorische Aktivität

Die Analyse der kumulativen, lokomotorischen Aktivität der Mäuse über einen Zeitraum von 24 h zeigt, dass die Injektion der physiologischen Kochsalzlösung-Lösung kaum einen Einfluss hatte, wohingegen die LPS-Injektionen (dosisabhängig) einen deutlichen Aktivitätsverlust bewirkten (Abbildung 15-3). In der Nacht und somit der Aktivitätsphase der Mäuse wurden die Unterschiede zwischen den Genotypen der Mäuse sowie zwischen den einzelnen Injektionen am deutlichsten. Nur die Wildtyp-Mäuse bewegten sich nach den beiden LPS-Injektionen (dosisabhängig) signifikant weniger (* $P < 0,05$) als nach der Saline-Injektion. Insgesamt bewegten sich allerdings die Knock-out-Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren signifikant weniger (# $P > 0,05$). Grundsätzlich war die Aktivität der Mäuse bei Tage sehr niedrig und die Wildtyp-Tiere unterschieden sich hier in ihrer Aktivität nicht signifikant von den Knock-out-Mäusen.

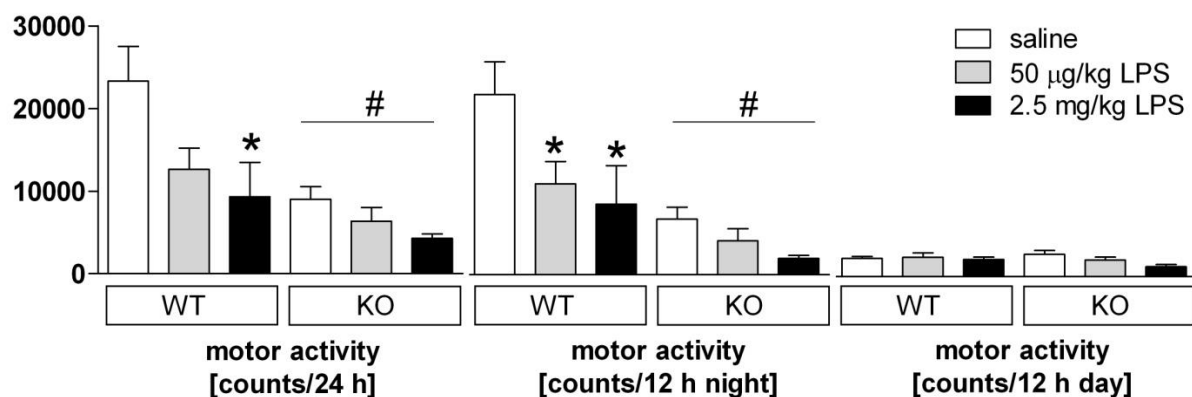


Abbildung 15-3

Kumulative, motorische Aktivität der Mäuse nach der Injektion der verschiedenen LPS-Dosen (50 µg/kg und 2,5 mg/kg KGW LPS) und der physiologischen Kochsalzlösung als Kontrollsubstanz.

Die Einzelaktivitäten, die sog. „counts“ wurden für die Hell- und Dunkelphasen (12 h) und für den Gesamtzeitraum analysiert (24 h).

* $P < 0,05$ im Vergleich zu Saline-Injektion; # $P < 0,05$ im Vergleich zum Genotyp „Wildtyp“

15.1.3. Aktivitätsmuster im zeitlichen Verlauf

15.1.3.1. Vergleich der verschiedenen Behandlungen innerhalb eines Genotyps

Mit der Analyse des Aktivitätsmusters (je über 15 Minuten gemittelte Gesamtaktivität) konnte man die Aktivität der Tiere über den gesamten Zeitverlauf detailliert und anschaulich betrachten. Es wurde deutlich, dass die physiologische Nachtaktivität der Wildtyp-Mäuse nach der Injektion der Saline-Lösung kaum beeinflusst wurde. Nach der Injektion von 50 µg/kg KGW LPS zeigte sich allerdings bereits eine Reduktion der Aktivität, vor allem im Zeitraum 10 bis 18 h. Dieser Aktivitätsverlust wurde nach der Injektion von 2,5 mg/kg KGW LPS verstärkt und war in der ersten Hälfte der Dunkelperiode besonders deutlich. Im Zeitraum 13 bis 19 h nach der Injektion zeigten die Wildtyp-Mäuse ihre maximale Bewegungsaktivität (Abbildung 15-4, A). Die NF-IL6-Knock-out Mäuse hingegen zeigten grundsätzlich eine sehr reduzierte motorische Aktivität verglichen mit den Wildtyp-Tieren, was vor allem in der Dunkelperiode offensichtlich wurde. Die Injektion der Saline-Lösung hatte keinen Einfluss auf die Aktivität. Hingegen bewirkten beide Dosen an LPS einen drastischen Aktivitätsverlust, wobei die hohe Dosis auch einen höheren Aktivitätsverlust zur Folge hatte. Die maximale Aktivität zeigten die Knock-out-Mäuse im Zeitraum 12 bis 14 h, welcher damit eindeutig kürzer war als der Aktivitätszeitraum der Wildtyp-Mäuse (t= 10-22 h) (Abbildung 15-4, B).

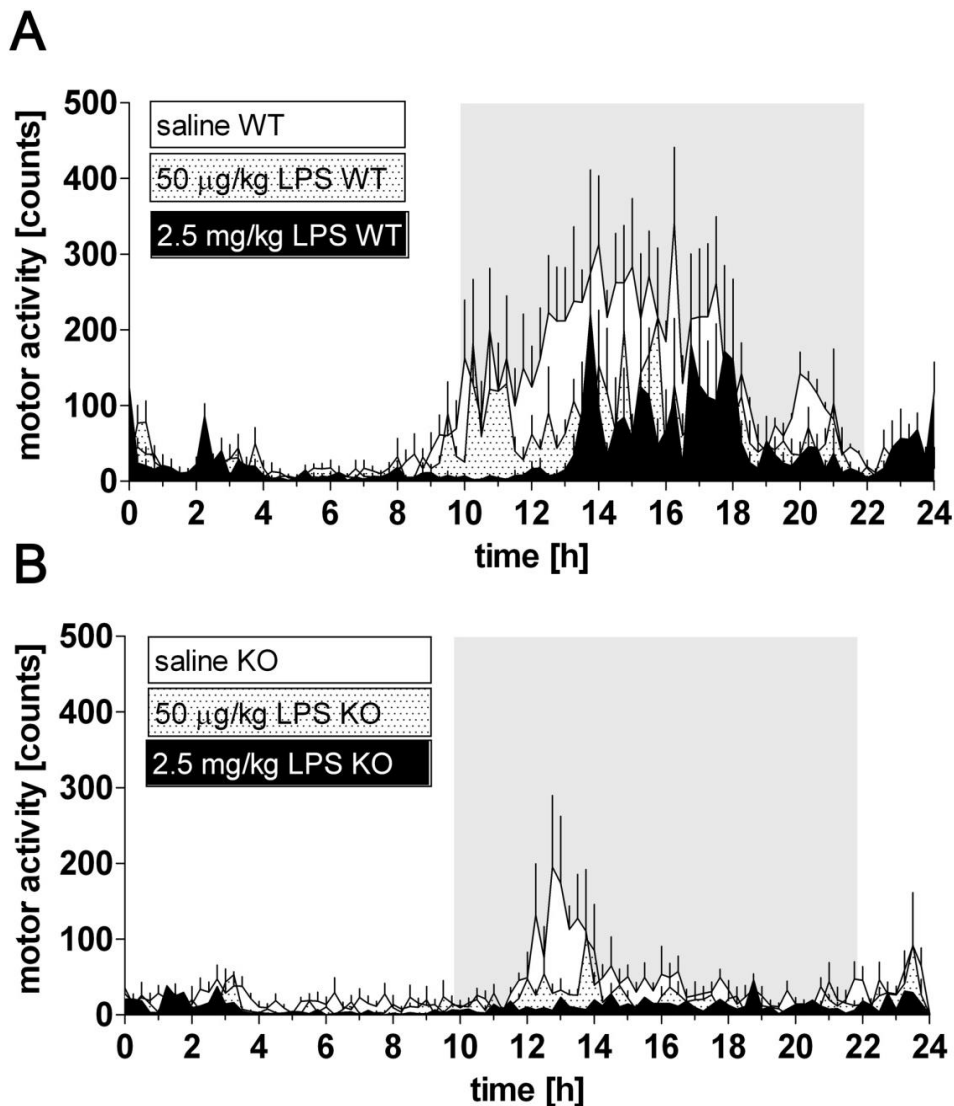


Abbildung 15-4

Aktivitätsmuster der Gesamtaktivität der Tiere im zeitlichen Verlauf über 24h.

(A) Vergleich der verschiedenen Behandlungen innerhalb des Genotyps „Wildtyp-Mäuse (WT)“; (B) Vergleich der verschiedenen Behandlungen innerhalb des Genotyps „NF-IL6-Knock-out-Mäuse (KO)“ Die Nachtphase ist grau hinterlegt.

Wenn man die Aktivitätsverläufe der Wildtyp-Mäuse und der Knock-out-Mäuse innerhalb einer Behandlung miteinander vergleicht, wird nochmal ersichtlich, dass sich die beiden Mausgenotypen hinsichtlich ihres Aktivitätsmusters deutlich unterscheiden (Abbildung 15-5). Nach der Injektion der niedrigen Dosis von 50 µg/kg KGW LPS reduzierte sich in der Dunkelphase die Aktivität beider Gruppen fast um 50 %. Die Tagphasen wurden nur minimal beeinflusst. Eine erhöhte Aktivität konnte bei den Wildtyp-Tieren bei $t = 10-12$ und $t = 14-16$ h festgestellt werden. Die Knock-out-Mäuse dagegen waren nur bei $t = 14$ h vermehrt aktiv. Nach der i.p. Injektion der hohen Dosis von 2,5 mg/kg KGW LPS war bei den Wildtyp-Tieren nur bei $t = 13-19$ h eine erhöhte Aktivität detektierbar, die sich auf einem ähnlichen Aktivitätsniveau befand wie die Aktivität nach der Injektion von 50 µg/kg KGW LPS. Die Knock-out-Mäuse zeigten eine drastisch reduzierte Aktivität über den gesamten Versuchszeitraum von 24 h ohne eine deutliche Erhöhung in der Dunkelphase.

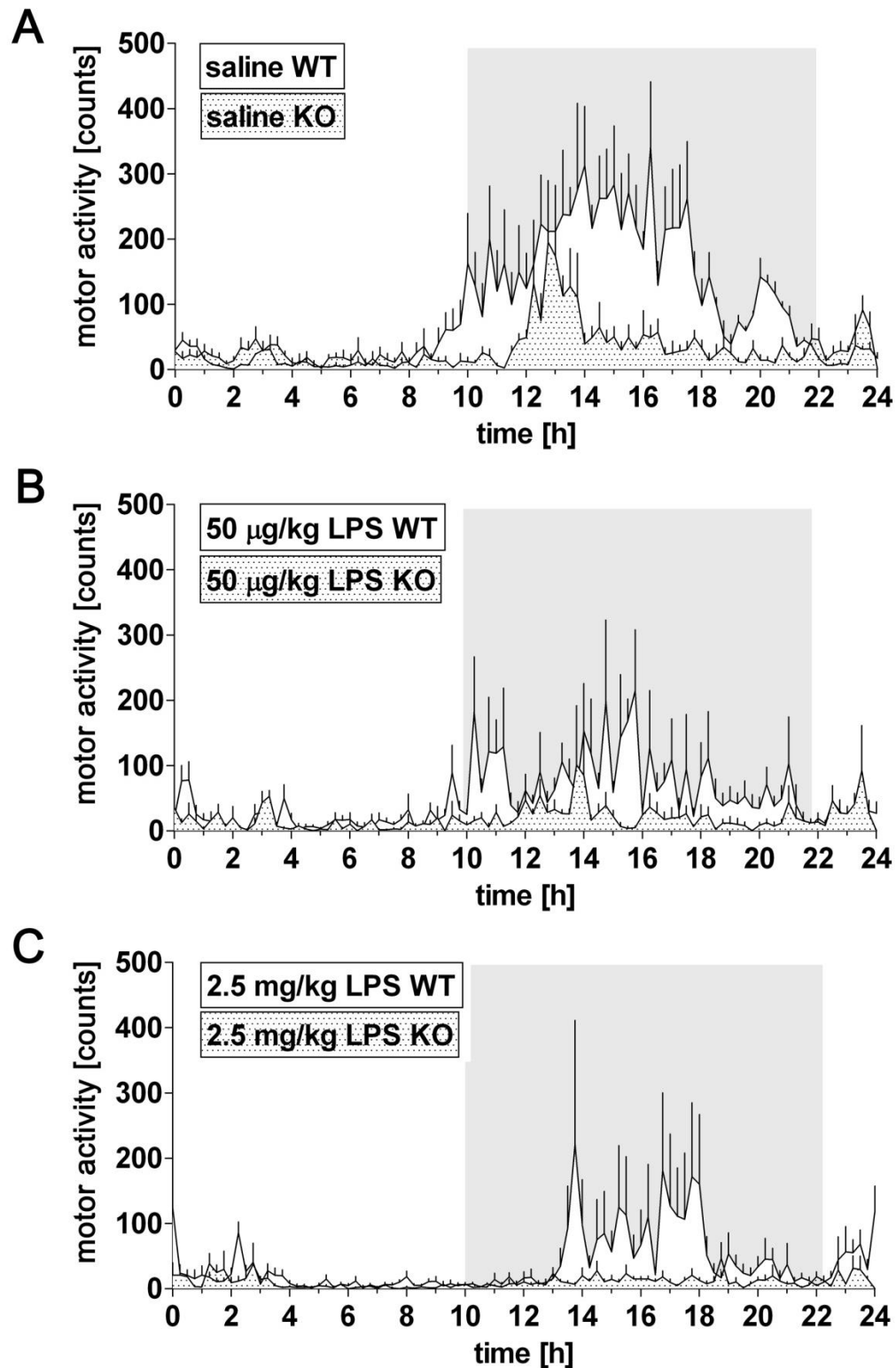


Abbildung 15-5

Aktivitätsmuster der Gesamtaktivität der Tiere im zeitlichen Verlauf über 24h. Vergleich zwischen den beiden Mausgenotypen innerhalb einer Behandlung (Saline, 50 µg/kg oder 2,5 mg/kg KGW LPS). Die Nachtphase ist grau hinterlegt.

15.1.4. Futter- und Wasseraufnahme sowie Entwicklung des Körpergewichtes

Zunächst wurde die Futter- und Wasseraufnahme (Abbildung 15-6), die über den gesamten Versuchszeitraum von 24 h aufgezeichnet wurde, nach den verschiedenen Behandlungen innerhalb eines Genotyps untersucht, um dann die Wildtyp- und NF-IL-6-Knock-out-Mäuse miteinander vergleichen zu können. Bei der Analyse der Futter- und Wasseraufnahme wurde zunächst die Baseline (durchschnittliche Futter- bzw. Wasseraufnahme der Tiere pro 24 h ohne Behandlung) mit den verschiedenen Behandlungen und danach die einzelnen Behandlungen einander gegenübergestellt. Vergleich man die Injektion von 50 µg/kg KGW LPS mit der Baseline und der Saline-Injektion, zeigte sich bei den Wildtyp-Mäusen bereits eine signifikante Reduktion (** $P < 0,01$ und ## $P < 0,01$) der aufgenommenen Futtermenge. Nach der Injektion von 2,5 mg/kg KGW LPS kam es zu einem noch stärkeren und signifikanten Abfall der Futteraufnahme im Vergleich zur Baseline und der Injektion von Saline bzw. der niedrigen Dosis LPS (*** $P < 0,001$, #### $P < 0,001$, \$\$\$ $P < 0,001$).

Bei den Knock-out-Mäusen zeigte sich nur nach der Injektion von 2,5 mg/kg KGW LPS eine signifikante Reduktion der Nahrungsaufnahme im Vergleich zur Baseline und der Saline-Injektion (** $P < 0,01$ und ## $P < 0,01$). Im direkten Vergleich konnte zwischen den Wildtyp-Mäusen und den NF-IL6-Knock-out-Mäusen hinsichtlich der Futteraufnahme kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Der Wasserkonsum wurde bei den Wildtyp-Tieren durch die Injektion der niedrigen Dosis LPS (50 µg/kg KGW) im Vergleich zur Wasseraufnahme nach der Saline-Injektion signifikant reduziert (# $P < 0,05$). Die Injektion der hohen Dosis LPS (2,5 mg/kg KGW) führte dazu, dass die Tiere ihre Wasseraufnahme um mehr als 50% reduzierten. Dies stellte einen signifikanten Unterschied verglichen mit der Baseline, der Injektion der Saline und der geringen Dosis an LPS dar (*** $P < 0,001$, #### $P < 0,001$, \$\$\$ $P < 0,001$). Bei den NF-IL6-Knock-out-Mäusen führte erneut nur die Injektion der hohen Dosis zu einer signifikanten Reduktion der Wasseraufnahme verglichen mit der Baseline und der Saline-Injektion (** $P < 0,01$ und ## $P < 0,01$).

Durch die Analyse der Entwicklung des Körpergewichtes beider Mausgenotypen nach den verschiedenen Behandlungen, sollten weitere Aussagen über die möglichen Auswirkungen des NF-IL6-Knock-outs und somit über die Rolle von NF-IL6 im Allgemeinen getroffen werden. Es fiel auf, dass sowohl bei den Wildtyp- als auch bei den Knock-out-Mäusen allein die i.p. Injektion der hohen Dosis LPS (2,5 mg/kg KGW) zu einer signifikanten Reduktion des Gewichtes am Folgetag nach der Injektion führte (*** $P < 0,001$, #### $P < 0,001$). Die Saline-Injektion und die Injektion der niedrigen Dosis hatten keinen nennenswerten negativen Einfluss auf das Körpergewicht, wobei die Knock-out-Mäuse am Folgetag dieser Injektionen sogar etwas an Gewicht zunahmen. Im direkten Vergleich konnten bei der Gewichtsentwicklung keine signifikanten Unterschiede zwischen den Wildtyp- und den Knock-out-Mäusen festgestellt werden (Abbildung 15-6).

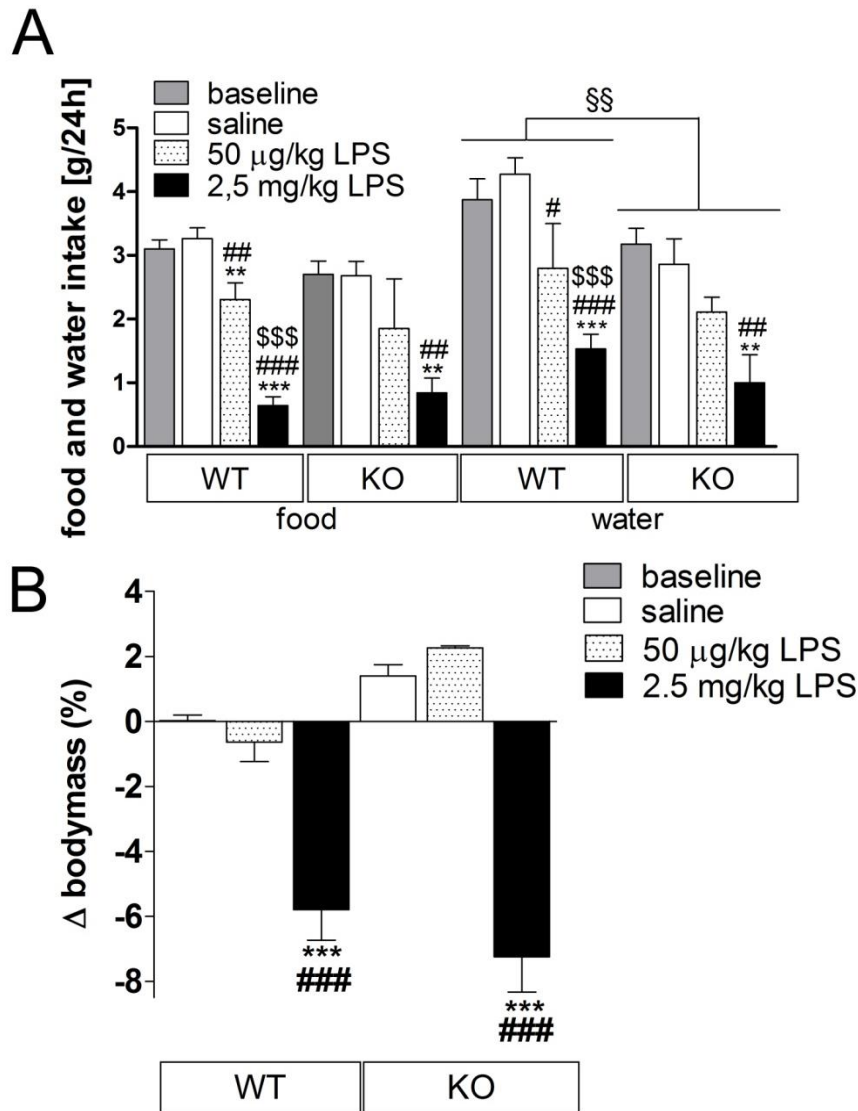


Abbildung 15-6

(A) Kumulative Futter- bzw. Wasseraufnahme über den gesamten Versuchszeitraum von 24 h nach i.p. Injektion von Saline-Lösung, 50 µg/kg bzw. 2,5 mg/kg KGW LPS.

Baseline: durchschnittliche Futter-bzw. Wasseraufnahme der Tiere pro 24 h ohne Behandlung.

Im Vergleich zur Baseline: *** $P < 0,001$ bzw. ** $P < 0,01$

Im Vergleich zur Saline-Injektion: ### $P < 0,001$ bzw. ## $P < 0,01$

Im Vergleich zur Injektion von 50 µg/kg KGW LPS: \$\$\$ $P < 0,001$

Unterschied zwischen den Genotypen WT und KO: §§ $P < 0,01$

(B) Entwicklung des Körpergewichtes in Prozent innerhalb von 24 h nach i.p. Injektion von Saline-Lösung, 50 µg/kg bzw. 2,5 mg/kg KGW LPS. Die Tiere wurden direkt vor dem Versuch (10 Uhr morgens) und zum Endpunkt der Messungen am nächsten Tag (10 Uhr morgens) gewogen.

Im Vergleich zur Saline-Injektion: *** $P < 0,001$

Im Vergleich zur Injektion von 50 µg/kg KGW LPS: ### $P < 0,001$

IV. DISKUSSION

Die im Rahmen dieser Arbeit vorgenommenen Untersuchungen dienen einem tiefergehenden Verständnis der durch einen peripheren Immunstimulus oder eine Stresssituation aktivierten Kommunikation zwischen Immunsystem und neuroendokrinem System.

Dazu erfolgt eine die bisher durchgeführten Studien (Damm et al., 2011) ergänzende Charakterisierung der Bedeutung und Funktion des für die Neuroimmunologie äußerst wichtigen Transkriptionsfaktors NF-IL6 bei der Entstehung von Fieber und weiteren zentralnervös kontrollierten Krankheitssymptomen. Unter anderem wurden durch die Verwendung von NF-IL6-defizienten Mäusen neue Erkenntnisse über die Bedeutung von NF-IL6 für physiologische Parameter gewonnen. Der Fokus richtet sich allerdings auf die potenzielle Rolle von NF-IL6 bei der Aktivierung der HPA-Achse, um auf diese Weise Rückschlüsse auf die Funktionen von NF-IL6 sowohl bei der adäquaten Reaktion des Organismus auf Stress als auch der Hemmung einer überschießenden Immunantwort zu ziehen.

16. NF-IL6-Immunreaktivität im Gehirn der Maus

Die bereits bei der Ratte gewonnenen Erkenntnisse bezüglich der teils LPS-induzierbaren, nukleären NF-IL6-Immunreaktivität in ausgewählten Regionen des Gehirns (Damm et al., 2011) sind, entsprechend der hier gewonnenen Ergebnisse, weitgehend auf die Maus übertragbar und gelten möglicherweise spezieübergreifend. In der vorliegenden Arbeit konnte zunächst eine konstitutive Expression von NF-IL6 im Hippocampus und im *Plexus choroideus* von Mäusen nachgewiesen werden (Abbildung 11-2). Erstmals war der Nachweis von NF-IL6-mRNA mittels in-situ-Hybridisierung von Kuo et al. im Jahre 1990 gelungen. Hierbei wurde bereits gezeigt, dass die höchste Konzentration dabei im Hippocampus vorliegt (Kuo et al., 1990). Neben dieser konstitutiven NF-IL6-Expression, konnte in Ependymzellen des dritten Ventrikels, in Endothelzellen und in der Hypophyse eine gewisse nukleäre Grundaktivität festgestellt werden, die sich durch eine LPS-Stimulation steigern ließ (Abbildung 11-1, Abbildung 11-2 und Abbildung 12-1). Von besonderem Interesse sind die sensorischen Circumventrikulären Organe (OVLT, SFO, ME) (siehe Kapitel 2). Diese zeigten in der vorliegenden Arbeit eine deutliche LPS-induzierte NF-IL6-Immunreaktivität (Abbildung 11-1). Dies unterstützt die Annahme, dass NF-IL6 an der humoralen Weiterleitung peripherer, inflammatorischer Signale aus dem Blutkreislauf an regulatorische Zentren des ZNS und somit an der Entstehung von zentralnervös kontrollierten Krankheitssymptomen beteiligt zu sein scheint (Roth et al., 2004, Damm et al., 2011).

Das SFO spielt zusammen mit dem OVLT nicht nur bei der Generierung von Fieber (Scammell et al., 1996, Takahashi et al., 1997), sondern auch zusammen mit weiteren CVO's bei der Entstehung von Krankheitssymptomen (Lethargie, Anorexie, Adipsie) (McKinley et al., 2003), die dem Komplex des „sickness behavior“ zugerechnet werden können, eine wichtige Rolle. Darüber hinaus konnten im SON sowie im PVN eindeutige NF-IL6-Signale detektiert werden. Diese großzelligen Kerngebiete sind nicht nur an der Regulation des

Wasserhaushaltes beteiligt (Antunes-Rodrigues et al., 2004), sondern es kommt ihnen vor allem in Stresssituationen eine besondere Wichtigkeit als Schnittstelle zwischen zentralem Nervensystem und endokrinem System zu (Chrousos, 2009, Ulrich-Lai and Herman, 2009). Da sowohl in der ME als auch im PVN nach LPS-Stimulation eine nukleäre NF-IL6-Immunreaktivität detektiert werden konnte, ergibt sich die Hypothese, dass dieser Transkriptionsfaktor eine potenzielle Rolle bei der Aktivierung der HPA-Achse spielen könnte. Zuvor war eine solche Hypothese bereits für die Spezies Ratte aufgestellt worden (Damm et al., 2011). Damm und Kollegen konnten allerdings keine LPS-induzierbare NF-IL6-Immunreaktivität im PVN nachweisen.

17. NF-IL6 in der LPS-induzierten bzw. stressinduzierten Aktivierung der HPA-Achse

Bereits 1997 konnte in einer früheren Studie von Stephanou et al. gezeigt werden, dass NF-IL6 am humanen CRH-Promotor binden kann (Stephanou et al., 1997). In der hier vorliegenden Arbeit wurde nun zum ersten Mal für die Maus immunhistochemisch bestätigt, dass NF-IL6 nach einem LPS-Stimulus in den Kernen der Zellen der ME, aber zusätzlich auch zum gleichen Zeitpunkt in den Zellkernen des PVN akkumuliert. Die ME stellt in diesem Zusammenhang nach dem PVN eine nächste „Ebene“ in der HPA-Achse dar. Die Endigungen der neurosekretorischen, parvozellulären Neurone des PVN projizieren über die ME in das Portalvenensystem der Hypophyse und können somit das produzierte CRH abgeben (Nickel et al., 1992, Silverman et al., 2005). Darüber hinaus ist bekannt, dass in der ME die Freisetzung von CRH auch indirekt über Prostaglandine oder NO veranlasst werden kann, indem möglicherweise NF-IL6 durch Bindung an die entsprechende Promotorregion die Transkription des COX-2-Gens bzw. des iNOS-Gens steigert (Kolyada and Madias, 2001, Chun and Surh, 2004). Damit wird die Vermutung untermauert, dass NF-IL6 in Stresssituationen und bei der Begrenzung von Immunreaktionen eine Bedeutung zukommt. Dies wird zusätzlich durch vorausgegangene Studien bestätigt, die zeigen, dass in Hypophysen-Adenomzellen eine Überexpression von NF-IL6 parallel zu einer erhöhten POMC-Expression nachgewiesen werden konnte (Abbud et al., 2004).

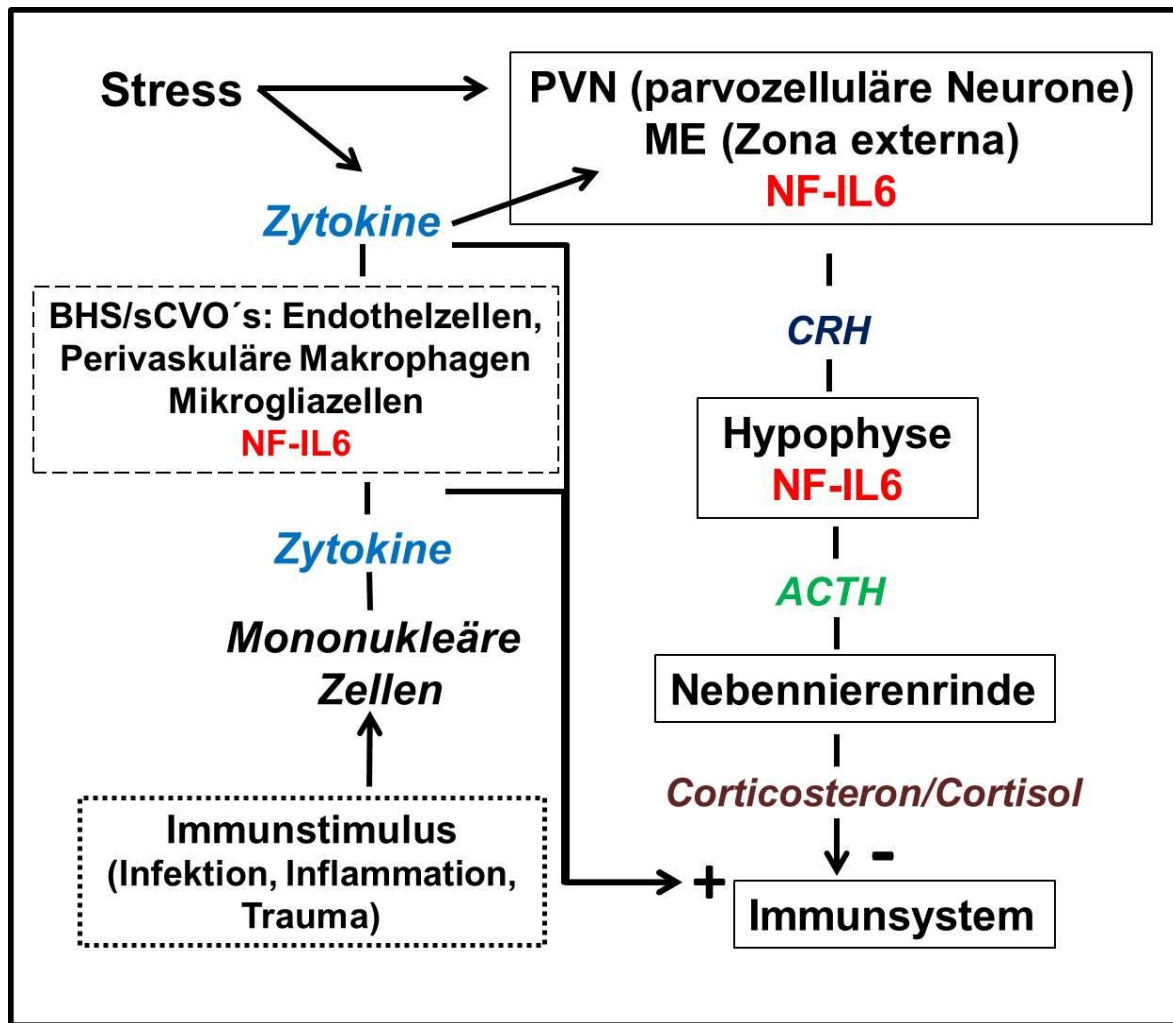


Abbildung 17-1

Schematische Darstellung der Aktivierung der HPA-Achse sowohl durch Stress als auch durch andere Immunstimuli und die dabei eine NF-IL6-Immunreaktivität zeigenden Gehirnregionen bzw. Zelltypen.

NF-IL6 spielt im Bereich der BHS (Endothelzellen, perivaskuläre Makrophagen, Mikrogliazellen etc.) bzw. der sensorischen Circumventrikulären Organe (OVLT, SFO, ME) eine wichtige Rolle bei der Weiterleitung peripherer Signale an entsprechende Regionen des ZNS. Des Weiteren wird die NF-IL6-Expression/Aktivierung sowohl nach einem LPS- als auch nach einem Stressstimulus im Hypothalamus (parvozelluläre Neurone des PVN), in der ME (*Zona externa*) sowie in zahlreichen Zellphänotypen in der Hypophyse gesteigert. Darüber hinaus ist NF-IL6 an der LPS-induzierten ACTH-Synthese beteiligt.

Das in die Blutzirkulation entlassene ACTH bewirkt die Ausschüttung von Corticosteron bzw. Cortisol aus der Rinde der Nebenniere. Diese Steroidhormone haben eine immunsuppressive Wirkung, indem sie unter anderem hemmend auf Transkriptionsfaktoren wie NFκB und damit auf die Aktivierung von Immunzellen wirken und somit eine überschießende Antwort des Immunsystems verhindern. Als negative Rückkopplung hemmen solche Hormone aber auch die ACTH- bzw. die CRH-Freisetzung.

Ob NF-IL6 auch eine potenzielle Rolle im Bereich der Nebenniere spielt, bleibt in zukünftigen Studien zu untersuchen.

17.1. NF-IL6 als Aktivierungsmarker in der Hypophyse im zeitlichen Verlauf nach LPS-Stimulation

In einer vorangehenden Studie konnte die Aktivierung von NF-IL6 in der Hypophyse bereits qualitativ dargestellt werden (Damm et al., 2011). In der hier vorliegenden Arbeit wurde daran anknüpfend zum ersten Mal in der Hypophyse von Ratten der Zeitverlauf der LPS-induzierten NF-IL6-Expression immunhistochemisch weiterführend untersucht. Neben einem eindeutigen Maximum der Signaldichte und Intensität zum Zeitpunkt 8 h p.i., konnten auch die Zellphänotypen NF-IL6-aktivierter Zellen näher charakterisiert werden (Abbildung 12-1). Darüber hinaus konnte in den Vorderlappen der Hypophysen 24 h nach Stimulation mit der hohen LPS-Dosis, im Vergleich zur niedrigen Dosis, eine höhere Anzahl an NF-IL6-Signalen detektiert werden. In zuvor durchgeführten Studien konnte bereits beobachtet werden, dass in Tieren, die mit einer hohen LPS-Dosis behandelt wurden, die Fieberreaktion nach 24 h noch nicht beendet war (Szekely and Szelenyi, 1979, Steiner et al., 2009). Auch Damm et al. (2011) konnten nach 24 h nur nach der Applikation der hohen LPS-Dosis (1 mg/kg KGW LPS) eine eindeutige NF-IL6-Immunreaktivität im Gehirn von Ratten detektieren (Damm et al., 2011). Dies lässt auf eine dosisabhängige Wirkung von NF-IL6 auch für die Hypophyse schließen. Die Tatsache, dass die Signaldichte von NF-IL6 zum Zeitpunkt 8 h p.i. ihr Maximum erreichte, bestätigt die Ergebnisse von Damm et al., die NF-IL6 als späten Zellaktivierungsmarker im Gehirn identifiziert haben (Damm et al., 2011). Des Weiteren soll NF-IL6 vor allem bei längerfristigen bzw. chronischen Entzündungsprozessen aktiviert sein bzw. könnte möglicherweise sogar für die Beendigung von Entzündungsreaktionen eine wichtige Rolle spielen (Damm et al., 2011, Damm, 2012). Entsprechend konnte bereits vor einigen Jahren nachgewiesen werden, dass NF-IL6 eine Schlüsselrolle bei der Regulation des TNF- α -Gens übernimmt und somit durchaus eine Bedeutung bei chronischen Erkrankungen mit erhöhten TNF- α -Konzentrationen (z. B. bei rheumatoider Arthritis in Gelenken) zukommt (Pope et al., 1994b, Pope et al., 1999). Strategien, die sich mit der selektiven Hemmung von NF-IL6 beschäftigen, werden dadurch auch in Zukunft eine hohe therapeutische Relevanz besitzen.

17.2. NF-IL6-Interaktion mit NF κ B und STAT3 im HVL nach LPS-Stimulation

Der Begriff „cross talk“ bedeutet, dass Transkriptionsfaktoren miteinander physikalisch interagieren können. Dadurch wird ihre Aktivität hemmend oder fördernd reguliert. Es hängt von einer direkten Interaktion ab, an welches Gen der Komplex bindet und ob schließlich ein bestimmtes Gen verstärkt oder vermindert exprimiert wird. Außerdem ist dadurch sogar eine Bindung an Promotoren möglich für die ein einzelner Transkriptionsfaktor gar keine Bindungsstelle besitzt. Bereits beschrieben sind die möglichen Interaktionen von NF-IL6 mit STAT3 bzw. NF κ B und die damit verbundenen potenziell synergistischen Effekte (Agrawal et al., 2003, Yoshida et al., 2004, Rummel et al., 2006). Zum einen können NF-IL6 und NF- κ B die Transkription von IL-6 synergistisch aktivieren (Matsusaka et al., 1993, Billack et al., 2002) und zum anderen kann STAT3 die NF-IL6-Transkription unterstützen (Niehof et al.,

2001). Darüber hinaus kann NF-IL6 die NF- κ B-Aktivität über I κ B α hemmen (Cappello et al., 2009). Auch eine „Zusammenarbeit“ von STAT3 und NF κ B wurde bereits in der Fachliteratur beschrieben (Heinrich et al., 1998b).

Bereits Lohrer et al. konnten im Jahr 2000 zeigen, dass in der Hypophyse LPS via CD14 und TLR4 in follikulostellaten Zellen den p38 α MAPK-NF κ B-Signalweg aktiviert und somit zur vermehrten Expression des IL-6-Gens führt (Lohrer et al., 2000). Ein Jahr später untersuchte Arzt (2001) die Signalwege der gp130 Zytokin-Familie in der Hypophyse und fand heraus, dass in den corticotropen Zellen der Hypophyse der Transkriptionsfaktor STAT3 für die IL-6-induzierte POMC-Expression benötigt wird (JAK-STAT-Signalweg) (Arzt, 2001). Des Weiteren ging er davon aus, dass das gp130 Molekül über das Adaptermolekül SHP2 („SH2-containing tyrosin phosphatase“) auch mit dem Ras/Raf/MAPK-Signalweg verbunden ist und dadurch eine NF-IL6-Aktivierung erfolgt (Arzt, 2001). Diese Beobachtungen unterstützen die Hypothese, dass bei akuten und chronischen Entzündungen oder Infektionen, auch Zytokine als immunmodulatorische Mediatoren im HVL eine bedeutende Rolle einnehmen.

Die hier vorliegende Arbeit zeigt nun erstmalig, dass im HVL die Transkriptionsfaktoren NF-IL6, STAT3 und NF κ B sowohl singular als auch in Interaktion miteinander auftreten und somit eine zeitlich aufeinanderfolgende sowie direkte Interaktion dieser Transkriptionsfaktoren möglich ist (Abbildung 12-2.). Diese Ergebnisse lassen die folgende Hypothese zu: ein synergistisches Zusammenwirken von NF-IL6 und NF κ B könnte nach LPS-Stimulation in follikulostellaten Zellen die Synthese von IL-6 (und evtl. auch von TNF- α) außerordentlich erhöhen und diese erhöhten IL-6-Konzentrationen könnten wiederum in corticotropen Zellen zu einem Synergismus der Aktivierung und Interaktion zwischen NF-IL6 und STAT3 führen (Abbildung 17-2). Dieses „Zusammenspiel“ könnte möglicherweise zur gesteigerten POMC-Expression und somit zu einer verstärkten ACTH-Produktion beitragen. Tatsächlich ist IL-6 in der Lage unabhängig von der CRH-Wirkung zu agieren und die ACTH-Freisetzung zu initiieren (Bethin et al., 2000). Neben den hier vorliegenden Ergebnissen zur Bedeutung von NF-IL6 im PVN bei der stressinduzierten Aktivierung der HPA-Achse (siehe Kapitel 13.2.1.2 und Abbildung 13-6), gibt es auch Hinweise darauf, dass dabei cAMP-abhängige Mechanismen, die c-Fos-Signalwege induzieren, beteiligt sind (Boutillier et al., 1991, Gautron et al., 2003).

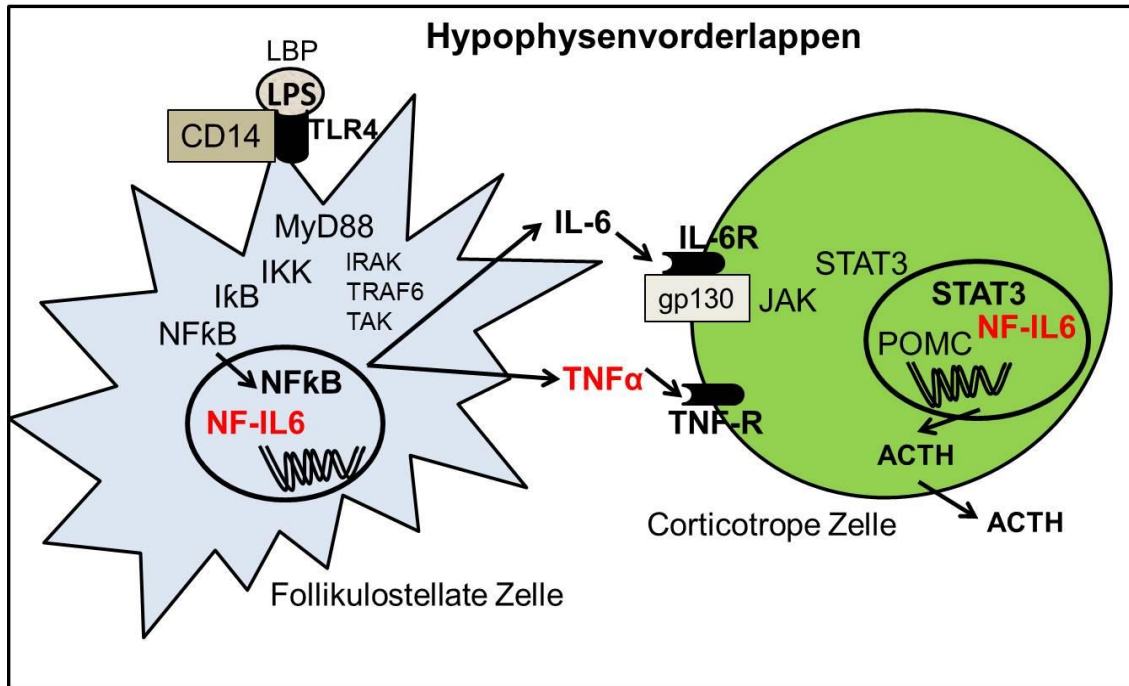


Abbildung 17-2

Schematische Darstellung der Zusammenhänge zwischen der LPS-stimulierten IL-6 bzw. TNF- α -Produktion durch follikulostellare Zellen (FS-Zelle) und der ACTH-Bildung und Freisetzung durch corticotrope Zellen im Vorderlappen der Hypophyse.

Durch eine synergistische Interaktion von NFκB mit NF-IL6 könnte womöglich eine LPS-induzierte, erhöhte Expression des IL-6 Gens stattfinden. Darüber hinaus könnte möglicherweise neben IL-6 auch TNF- α synthetisiert werden. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass NF-IL6 für die LPS-induzierte TNF- α -Synthese eine Rolle spielt. Allerdings konnte nicht eindeutig geklärt werden in welchem Ausmaß TNF- α an der ACTH-Produktion beteiligt ist. Möglicherweise findet in corticotropen Zellen ein synergistisches Zusammenwirken von STAT3 mit NF-IL6 statt, welches in einer erhöhten Expression des POMC-Gens resultiert. Das Prohormon POMC wird dann in ACTH und weitere Spaltprodukte aufgespalten.

Abbildung modifiziert nach (Arzt, 2001).

17.3. NF-IL6-immunreaktive Zellphänotypen und ihre mögliche Funktion in der Hypophyse von Ratten nach einem infektiösem oder einem psychologischen Stimulus

Bisher konnten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* NF-IL6-Signale in mit LPS oder Zytokinen stimulierten Neuronen, Astrozyten und ruhenden Mirkogliazellen im Gehirn nachgewiesen werden (Pahan et al., 2002, Ejarque-Ortiz et al., 2007). Des Weiteren ist bereits bekannt, dass Endothelzellen der Lunge (Kolyada and Madias, 2001) sowie Gehirnzellen von Ratten (Damm et al., 2011) eine NF-IL6-Immunreaktivität nach LPS-Stimulation aufweisen. In der vorliegenden Arbeit konnte nun erstmalig gezeigt werden, dass nach LPS-Stimulation in allen Anteilen der gesamten Hypophyse Endothelzellen und perivaskuläre Makrophagen eine eindeutige NF-IL6-Immunreaktivität aufwiesen. Im Vorderlappen kolokalisierten corticotrope Zellen und im Hinterlappen sowohl Pituizyten als auch Neuronenausläufer mit einem NF-IL6-Signal (Abbildung 12-3 und Abbildung 12-4). Es muss bedacht werden, dass die NF-IL6-

positiven, perivaskulären Makrophagen auch mit CD68 (einem Markerprotein für aktivierte Mikrogliazellen) markiert wurden. Aktivierte Mikrogliazellen kommen gar nicht in der Hypophyse vor. Die verwendeten Antikörper (CD68 und CD163) können allerdings auch neutrophile Granulozyten anfärben (Saito et al., 1991, Wu et al., 2003, Matsumoto et al., 2007). Eine Markierung von neutrophilen Granulozyten bei den hier vorliegenden Untersuchungen ist aber auszuschließen, da bei der verwendeten LPS-Dosis (100 µg/kg KGW LPS) und dem Untersuchungszeitpunkt von 8 h p.i. ein Einwandern dieser Zellen in die Hypophyse als sehr unwahrscheinlich einzustufen ist (Rummel et al., 2010).

Es stellt sich nun die Frage, welche Aufgabe und Funktion den identifizierten sowie mit NF-IL6 colokalisierenden Zellen in der Hypophyse zukommt. Sowohl für Endothelzellen als auch für perivaskuläre Makrophagen ist die Signalweiterleitung von peripheren Signalen aus dem Blutkreislauf ins Gehirnparenchym nachgewiesen worden (Bechmann et al., 2001, Damm, 2012). Auch in der Hypophyse befinden sich Endothelzellen in der idealen Position, um nach einem peripheren Immunstimulus im Blut zirkulierende Zytokine über den entsprechenden Zytokinrezeptor zu binden und dieses Signal z. B. über die Produktion von sekundären Mediatoren (PGE₂, Zytokine) weiterzuleiten. Es wurde festgestellt, dass der die COX-2-Expression auslösende Immunstimulus (z. B. die LPS-Dosis) bei Endothelzellen recht hoch sein muss (Schiltz and Sawchenko, 2002a). In anderen Studien zeigten perivaskulären Makrophagen hingegen eine weitaus geringere „Reizschwelle“ als Endothelzellen und produzierten schon bei niedrigen LPS-Dosen oder nach der systemischen Applikation von IL-1β PGE₂ (Elmqvist et al., 1997a, Schiltz and Sawchenko, 2002b, Serrats et al., 2010). Aufgrund des in der Hypophyse vorliegenden fenestrierten Endothels ist es auch den perivaskulären Makrophagen möglich, in einen direkten Kontakt mit den im Blutkreislauf zirkulierenden Stoffen zu treten. Da bereits bekannt ist, dass NF-IL6 eine Bindungsstelle am COX-2 Promotor besitzt (Kosaka et al., 1994) (siehe Kapitel 5.6), besteht durchaus die Möglichkeit, dass NF-IL6 in diesen Zellen an der PGE₂-Produktion beteiligt sein könnte. Bei der in der vorliegenden Arbeit genutzten LPS-Dosis von 100 µg/kg KGW liegt die Vermutung nahe, dass sowohl aktivierte Endothelzellen als auch aktivierte perivaskuläre Makrophagen in der Hypophyse PGE₂ als wichtigen, sekundären Mediator bilden, um beispielsweise corticotrope Zellen und die damit verbundene ACTH-Freisetzung zu beeinflussen. Eine mögliche Rolle von Prostaglandinen für die LPS-induzierte Aktivierung der HPA-Achse wurde bereits in mehreren Studien untersucht, allerdings vorwiegend im Bereich des Hypothalamus (PVN) und noch nicht in der Hypophyse selbst (Katsuura et al., 1990, Rivier and Vale, 1991, Ericsson et al., 1997). Auch Turnbull und Rivier (1999) haben die Freisetzung von ACTH und die darauffolgende Freisetzung von Glucocorticoiden durch PGE₂ bereits postuliert (Turnbull and Rivier, 1999).

Die Axone der Perikaryen des PVN und des SON sowie Pituizyten des HHL zeigten, wie oben erwähnt, nach LPS-Stimulation ebenfalls eine NF-IL6-Immunreaktivität in der Hypophyse. Allgemein bekannt ist bereits, dass LPS und Zytokine, wie IL-1β und TNF-α, die Synthese von NF-IL6-mRNA in Astrozyten bewirken können (Cardinaux et al., 2000, Pahan et al., 2002). Deshalb kann vermutet werden, dass die astrozytenartigen Pituizyten durch eine ähnliche Art und Weise stimuliert werden und im Zuge dessen eine *de novo*-

Synthese/Aktivierung von NF-IL6 stattfindet, um die Transkription entsprechender Zielgene einzuleiten.

Ejarque-Ortiz und Kollegen haben im Jahr 2007 bereits nachgewiesen, dass eine LPS-Stimulation zu einer deutlichen NF-IL6-Aktivierung in Astrozyten führt (Ejarque-Ortiz et al., 2007). Aufgrund dieser bereits vorhandenen Daten, lässt sich auf eine mögliche Beteiligung dieser astrozytenartigen Pituizyten an der Signalweiterleitung oder auf eine Rolle in der Kommunikation innerhalb der Hypophyse schließen. Insgesamt weisen die hier vorliegenden Ergebnisse auf eine Bedeutung von NF-IL6 für die LPS-induzierte Produktion bzw. Freisetzung von ACTH aus corticotropen Zellen oder die Bildung proinflammatorischer Zytokine bzw. anderer Mediatoren (PGE_2 , NO) in der Hypophyse hin.

Interessanterweise konnte hier erstmalig gezeigt werden, dass es nach einem psychologischen Stressstimulus (ausgelöst durch ein Open Field Stress Experiment) auch zu einer starken NF-IL6-Aktivierung in der Hypophyse kommt. Hierbei konnte allerdings nur ein Teil der aktivierten Zellen als perivaskuläre Makrophagen, und nicht als einer der anderen untersuchten Zellphänotypen, identifiziert werden.

Vorausgegangene Studien zeigten auch, dass nach der Injektion von IL-1 oder LPS katecholaminerge Neurone im Hirnstamm durch von Endothelzellen (Matsumura et al., 1998) und perivaskulären Makrophagen (Schiltz and Sawchenko, 2002a) produziertes PGE_2 aktiviert werden können (Serrats et al., 2010). Diese katecholaminergen Neurone ziehen zu CRH-Neuronen des PVN, um so die HPA-Achse zu aktivieren (Serrats et al., 2010). Somit könnte dieser neuronale Schaltkreis, bei dem in der vorliegenden Studie verwendeten Open Field Stress, eine Rolle für die Aktivierung von NF-IL6 in der Hypophyse und dem PVN gespielt haben. Im Gegensatz dazu, könnte die Aktivierung der perivaskulären Makrophagen in der Hypophyse nach dem Open Field Stress durch die signifikant angestiegenen Plasmakonzentrationen von IL-6 hervorgerufen worden sein (ohne eine Aktivierung der im PVN befindlichen Neurone). Das zirkulierende IL-6 hat durch das fenestrierte Endothel eine direkte Kontaktmöglichkeit, um perivaskuläre Makrophagen und auch andere Zellen stimulieren zu können. Da auf Monozyten und Makrophagen IL-6-Rezeptoren existieren (Bauer et al., 1989), erscheint eine IL-6-Bindung, an die in der Hypophyse befindlichen perivaskulären Makrophagen, wahrscheinlich. Diese Möglichkeit der direkten Kontaktaufnahme zwischen einem bzw. mehreren zirkulierenden Zytokinen und Zellen der Hypophyse, sollte in zukünftigen Studien weitergehend untersucht werden, um ein tiefergehendes Verständnis der Kommunikation zwischen Zellen des Immunsystems und Organen des endokrinen Systems zu erlangen.

In anderen Studien wurde eine Bedeutung von PGE_2 , die von Astrozyten und Neuronen der präoptischen Region gebildet wurden, für die Entstehung einer Hyperthermie bzw. eines psychogenen Fiebers bereits postuliert (Morimoto et al., 1991). In diesem Zuge könnte auch eine stressinduzierte Aktivierung der HPA-Achse stattfinden, so dass der die perivaskulären Makrophagen aktivierende Stimulus seinen Ursprung im Hypothalamus (PVN) hat und nicht in der Hypophyse.

17.4. Beteiligung von NF-IL6 und anderen Transkriptionsfaktoren an der ACTH-Synthese in corticotropen Zellen der Hypophyse

Die in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal gezeigte LPS-induzierte Colokalisation von NF-IL6 mit ACTH-positiven Zellen im HVL lässt die Hypothese zu, dass die gesteigerte NF-IL6-Expression an der LPS-induzierten ACTH-Produktion beteiligt ist. Dies wird durch vorausgegangene Studien untermauert, die zeigen konnten, dass eine Bindungsstelle für NF-IL6 am POMC-Promotor existiert (Abbud et al., 2004). Darüber hinaus haben Iwasaki et al. (2008) herausgefunden, dass LPS über den TLR4 corticotrope Zellen des Vorderlappens stimuliert und dadurch die POMC-Expression erhöht werden kann. Dies resultiert in einer verstärkten Bildung, aber nicht in einer Freisetzung von ACTH. Es wird daher vermutet, dass die Freisetzung von ACTH über CRH-abhängige Mechanismen beeinflusst wird (Iwasaki et al., 2008). NF-IL6 ist wahrscheinlich auch über diesen (TLR4-vermittelten) Signalweg an der POMC-Expression beteiligt. Allerdings bleibt dies in zukünftigen Studien zu untersuchen.

Im Gegensatz dazu, konnten nach einem psychologischen Stimulus keine NF-IL6-positiven, corticotropen Zellen detektiert werden. Deshalb stellt sich in diesem Zusammenhang die Frage, ob der in der Studie angewandte Stressstimulus (Open Field Stress) nicht ausreichend stark gewesen war, um eine NF-IL6-Translokation in den Nukleus der corticotropen Zellen der Hypophyse zu verursachen oder ob die beobachtete NF-IL6-Aktivierung in anderen Zellen der Hypophyse und z.B. im PVN, indirekt an der Freisetzung von ACTH beteiligt sein könnte. Hier wäre unter anderem eine Beteiligung anderer Peptide wie z. B. PACAP („pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide“) an einer erhöhten Freisetzung von ACTH denkbar. Es ist bereits bekannt, dass PACAP nach einem psychologischen Stressstimulus (Open Field Stress) über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren an CRH Neurone des PVN binden, eine CRH-Expression stimulieren und somit über die CRH-vermittelte Aktivierung von corticotropen Zellen im HVL an einer erhöhten ACTH-Freisetzung beteiligt sein kann (Grinevich et al., 1997, Tsukiyama et al., 2011). Darüber hinaus besitzt NF-IL6 eine Bindungsstelle am Promotor des PACAP-II-Rezeptors (Sreedharan et al., 1995) und kann somit zu einer erhöhten Expression dieses Rezeptors beitragen. Das bedeutet, dass NF-IL6 über die erhöhte Expression des Rezeptors an der PACAP-vermittelten ACTH-Freisetzung beteiligt sein könnte. Entsprechend ist die „Stressantwort“ bei PACAP-defizienten Mäusen verringert, was erneut eine mögliche Beteiligung dieses Neuropeptids und damit auch von NF-IL6 bei der Verarbeitung von Stresssituationen verdeutlicht (Tsukiyama et al., 2011).

Gegen die oben genannte These des nicht ausreichenden Stressstimulus spricht die Tatsache, dass eine große Anzahl an NF-IL6-positiven Zellen nach Open Field Stress in der Hypophyse detektierbar waren. Allerdings konnte nur ein kleiner Anteil dieser Zellen phänotypisiert werden und zwar als perivaskuläre Makrophagen. Es besteht die Möglichkeit, dass NF-IL6 differenziell bei einer LPS-induzierten, nicht aber bei einer stressinduzierten Aktivierung in der gleichen Weise beteiligt sein könnte. In zukünftigen Studien sollte z. B. durch die Anwendung einer selektiven Hemmung von NF-IL6 die Rolle des Transkriptionsfaktors in der LPS-induzierten bzw. stressinduzierten POMC-Expression und somit in der ACTH-Produktion tiefergehend untersucht werden. Dies würde maßgeblich zu einem besseren

Verständnis der möglichen Funktion von NF-IL6 in der Hypophyse beitragen und das Gesamtbild der möglichen Bedeutung von NF-IL6 für den Organismus vervollständigen. Dabei könnte durch weitergehende Analysen (z. B. mittels einer ACTH-Messung im Plasma der Versuchstiere) festgestellt werden, ob bei der Aktivierung der HPA-Achse durch einen Open Field Stress, der Transkriptionsfaktor NF-IL6 tatsächlich eine Rolle spielt. Hierfür könnten in weiterführenden Untersuchungen auch NF-IL6-Knock-out-Mäuse verwendet werden.

In einer Studie von Mehet et al. (2012) konnte bei Ratten, die einem sog. „restraint-stress“ ausgesetzt wurden, gezeigt werden, dass eine erhöhte Aktivität des Transkriptionsfaktors NFκB (sowohl 15 als auch 30 Minuten nach Beginn der Stresssituation) in Zellen des HVL vorlag (Mehet et al., 2012). Dies steht nicht im Einklang mit den für die vorliegende Arbeit beobachteten Ergebnissen, da hier 90 Minuten nach einem Open Field Stress im HVL keine NFκB oder STAT3-Aktivität verzeichnet werden konnte (siehe Kapitel 13.2.2). Dies lässt sich möglicherweise auf die Anwendung unterschiedlich starker Stressstimuli oder auf einen zu späten Untersuchungszeitpunkt zurückführen und sollte zukünftig in weiteren Untersuchungen z. B. durch die Anwendung unterschiedlicher Stresssituationen und verschiedener Untersuchungszeitpunkte (z. B. 15, 30, 45, 60 Minuten) verifiziert werden.

18. „Effekte“ des Open Field Stress Experiments und der mögliche Zusammenhang mit NF-IL6

18.1. Stressinduzierte Erhöhung der Körperkerntemperatur bei Ratten

Das auch als „psychogene Fieber“ bekannte physiologische Phänomen der erhöhten Körperkerntemperatur vor, in und nach Stresssituationen ist beim Menschen seit sehr vielen Jahren bekannt. Allerdings war lange nicht klar, ob es sich um ein echtes Fieber oder eine Hyperthermie handelt (Miric et al., 1997). Auch bei Labortieren ist dieses Phänomen bereits vielfach untersucht worden. Durch „Handling“ oder durch Umsetzen des Tieres in einen neuen, großen Käfig („open field“) konnte ein Anstieg der Körperkerntemperatur von bis zu 2°C hervorgerufen werden (Briese and De Quijada, 1970, Singer et al., 1986b). Bis dato wird kontrovers diskutiert, welche Mechanismen für die erhöhte Temperatur verantwortlich sein könnten. Die Anwendung von Cyclooxygenase-Hemmern führte zu einer Unterdrückung von LPS-induziertem Fieber und zum anderen auch zu einer Abschwächung der durch einen Open Field Stress Versuch verursachten Temperaturerhöhung (Singer et al., 1986b, Kluger et al., 1987). Allerdings muss die letztgenannte Beobachtung kritisch gesehen werden, da andere Studien besagen, dass Cyclooxygenase-Hemmer ausschließlich infektionsbedingtes und kein stressinduziertes Fieber hemmen können (Steiner and Branco, 2000, Vinkers et al., 2009). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Mäuse, die defizient für den Prostaglandinrezeptor EP3 sind, zwar eine stressinduzierte Temperaturerhöhung aufweisen, aber kein LPS-induziertes Fieber entwickeln können (Oka et al., 2003). Das heißt, es wird weiterhin kontrovers diskutiert werden müssen, ob Prostaglandine an der Entstehung von stressinduzierten Temperaturerhöhungen beteiligt sind (Morimoto et al., 1991).

Nach Open Field Stress konnte keine erhöhte Expression von NF κ B oder STAT3 in der Hypophyse festgestellt werden (siehe Kapitel 13.2.2). Da die verstärkte Expression dieser Transkriptionsfaktoren typischerweise mit einer erhöhten COX-2-Expression zusammenhängt (Nadjar et al., 2005, Rummel et al., 2006), ist dies ein weiterer Hinweis auf PGE₂-unabhängige Mechanismen. Man würde allerdings im Fall einer PGE₂-Beteiligung davon ausgehen, dass nach einem psychologischen Stressstimulus noradrenerge Neurone im *Locus caeruleus* der Pons aktiviert werden, die das periphere Stresssignal in die präoptische Region des Hypothalamus weiterleiten (Glavin, 1985). Dort wird über die Freisetzung von Noradrenalin die Synthese und Freisetzung von PGE₂ aus Neuronen und Astrozyten bewirkt. Dieses PGE₂ bindet an EP3-Rezeptoren des *Nucleus praeopticus medianus*, was einen Anstieg der Körperkerntemperatur zur Folge hat (Abercrombie and Jacobs, 1987, Nakane et al., 1994). Andere Untersuchungen unterstützen die Vermutung, dass das psychogene Fieber zentralnervös kontrolliert und somit ein „echtes“ Fieber darstellt (Briese and Cabanac, 1991). Es ist bekannt, dass Glucocorticoide sowohl das LPS-induzierte als auch das stressinduzierte Fieber hemmen können und dabei vor allem der Hippocampus, aufgrund seiner hohen Rezeptordichte für Glucocorticoidrezeptoren, eine wichtige Rolle einnimmt (Morrow et al., 1993, Morrow et al., 1996). Darüber hinaus besteht die Annahme, dass Noradrenalin und die entsprechenden β -Adrenorezeptoren in braunem Fettgewebe (Zhao et al., 1994) an der Entstehung des stressinduzierten Temperaturanstiegs beteiligt sein könnten (Shibata and Nagasaka, 1984, Soszynski et al., 1996). Es bleibt anzumerken, dass der durch ein Open Field Stress Versuch verursachte Anstieg der Temperatur sofort nach Beginn des Versuches einsetzt, monophasisch verläuft und schließlich nach wenigen Stunden seine Basiswerte wieder erreicht (Abbildung 13-1). Damit unterscheidet sich dieser Temperaturanstieg deutlich von einem mehrphasischen, LPS-induzierten Fieber (Oka et al., 2003, Vinkers et al., 2009, Damm et al., 2011).

Es liegen mehrere Studien vor, die einen Zusammenhang zwischen dem stressinduzierten Temperaturanstieg und einer erhöhten Plasmakonzentration an proinflammatorischen Zytokinen postulieren (Steptoe et al., 2001, Owen and Steptoe, 2003, Steptoe et al., 2007). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit bezüglich einer erhöhten IL-6-Konzentration (Zeitpunkt t= 60 Minuten) bestätigt werden. Im Gegensatz dazu, konnten keine messbaren TNF- α -Konzentrationen in den Plasmaproben der Versuchstiere detektiert werden (siehe Kapitel 13.1.2). Diese möglicherweise über Katecholamine vermittelte Hemmung der TNF- α -Freisetzung während einer akuten Stresssituation, wurde bereits mehrfach bei Untersuchungen zur „Schnittstelle“ zwischen Immunsystem und sympathischen Nervensystem beobachtet (Liao et al., 1995, Kalinichenko et al., 1999, Elenkov et al., 2000, Huang et al., 2011). In der vorliegenden Arbeit ist ein kausaler Zusammenhang zwischen dem beobachteten Maximum der Körperkerntemperatur (t= 60-90 Minuten), dem gemessenen Maximum der IL-6-Konzentration im Plasma (t= 60 Minuten) (Abbildung 13-1) und der maximalen motorischen Aktivität der Versuchstiere (t= 30-60 Minuten) (Abbildung 13-2) naheliegend. Interessanter Weise zeigten Long et al. (1990) jedoch, dass nach einem sog. „cage-switch stress“ der Anstieg der Körperkerntemperatur sowohl im Bereich der thermoneutralen Zone (25°C) als auch darunter (11,1°C) nicht mit einer erhöhten motorischen

Aktivität korreliert (Long et al., 1990c) und unabhängig von der Umgebungstemperatur ist (Long et al., 1990b). Um den genauen Zusammenhang zwischen der lokomotorischen Aktivität der Tiere und dem stressinduzierten Fieber abschließend klären zu können, bedarf es in Zukunft weiterer Untersuchungen. Eine Möglichkeit wäre die Untersuchung von Ratten und Mäusen während und auch nach dem Open Field Stress Versuch mit einer Wärmebildkamera. Dadurch könnte festgestellt werden, ob die beobachtete Erhöhung der Körperkerntemperatur mit einer erhöhten motorischen Aktivität verbunden ist oder aber mit der Aktivierung von braunem Fettgewebe über den Sympathikus einhergeht.

18.1.1. Ein Vergleich der Ergebnisse bei Ratten mit den in NF-IL6-Knock-out-Mäusen erhobenen Befunden

Zur weiteren Klärung der Bedeutung von NF-IL6 in der Thermoregulation nach der Anwendung eines Open Field Stress, wurden NF-IL6-Knock-out-Mäuse verwendet. Sowohl die NF-IL6-Knock-out-Mäuse als auch die Wildtyp-Mäuse zeigten im Open Field Stress Versuch einen signifikanten Temperaturanstieg im Vergleich zu ihrer eigenen Temperatur-Baseline des Vortages. Auffällig war bei beiden Versuchsgruppen ein starkes Absinken der Körperkerntemperatur gegen Ende des Versuchszeitraumes (siehe Kapitel 13.1.3., Abbildung 13-4). Bereits bei früheren Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass die Körperkerntemperatur der Maus starken Schwankungen unterworfen sein kann (Gordon, 2012b, a). Das heißt, dass die gesunkene Körperkerntemperatur auch dadurch erklärt werden könnte, dass die sehr geringe Bewegungsaktivität der Mäuse gegen Ende des Versuches zu einem Abfall der Körperkerntemperatur geführt hat. Eine ähnliche Verhaltensweise können Mäuse zeigen, wenn sie in einen sog. „Torpor“ übergehen und dabei ihre Körperkerntemperatur temporär absinkt. Dies zeigt sich z. B. in Phasen des Energiemangels, wenn kein ausreichendes Nahrungsangebot vorliegt (Gordon, 2012b).

Interessanterweise war die Erhöhung der Körperkerntemperatur der NF-IL6-Knock-out-Mäuse nach Open Field Stress deutlich geringer und kürzer. Außerdem führte dieser Stimulus zu signifikant niedrigeren Körperkerntemperaturen in diesen Tieren im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren (Abbildung 13-4). Dies könnte ein Anhaltspunkt dafür sein, dass NF-IL6 an der stressinduzierten Erhöhung der Körperkerntemperatur beteiligt ist. Tatsächlich war auch die Basaltemperatur der NF-IL6-Knock-out-Mäuse niedriger (Abbildung 13-3). Sie zeigten eine flachere „Baseline“ im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen. Dies untermauert die Vermutung, dass eine Beteiligung des Transkriptionsfaktors NF-IL6 bei der Aufrechterhaltung einer „Basis“-Körperkerntemperatur möglich sein könnte. Vor allem in der Nacht und somit zum Zeitpunkt der höchsten Aktivität der Tiere war der Unterschied signifikant. Außerdem könnte die Rolle von NF-IL6 für die Körperkerntemperatur wieder über eine Beeinflussung der motorischen Aktivität erklärt werden.

Bereits publizierte Studien konnten zeigen, dass der Neurotransmitter Dopamin eine wichtige Rolle bei der Beeinflussung von Körperkerntemperatur sowie lokomotorischer Aktivität zu spielen scheint (Boulay et al., 1999a, Boulay et al., 1999b). Möglicherweise sind diese Dopamin-abhängigen Mechanismen im Gehirn der Knock-out-Mäuse beeinträchtigt und führen somit zu einer dauerhaft bestehenden und erniedrigten lokomotorischen Aktivität

sowie zu einer konstant erniedrigten Basaltemperatur. Dies ist eine unerwartete Beobachtung, die zuvor noch nie beschrieben wurde und sollte auch deshalb in zukünftigen Studien weitergehend untersucht werden. Bisher sind keine direkten Studien bezüglich NF-IL6 und seiner Beteiligung an der Dopaminsynthese bzw. der Expression von Dopaminrezeptoren durchgeführt worden. Trotzdem scheint Dopamin an einer Aktivierung von NF-IL6 beteiligt zu sein (Gomez-Santos et al., 2005) und hierbei in einer positiven Rückkopplung die Wirkung von Dopamin zu verstärken (Kovacs et al., 2006). Diese bei Untersuchungen zur Drogensucht gewonnen Erkenntnisse (auf die hier vorliegenden Ergebnisse übertragen) könnten erklären, warum die NF-IL6-Knock-out-Mäuse nach der Stimulation eine verkürzte erhöhte motorische Aktivität zeigten und basal eine drastisch reduzierte Aktivität im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren aufwiesen. Folglich könnten diese Mäuse womöglich auch für weiterführende Untersuchungen zur Drogensucht von Interesse sein. Diese Hinweise sollten in zukünftigen Studien durch die Analyse von Plasmazytokinen, durch immunhistochemische bzw. molekularbiologische Untersuchungen der Gehirne und vor allem durch die Untersuchung des Dopaminsystems überprüft und ergänzt werden.

Abschließend bleibt anzumerken, dass die Knock-out-Mäuse im Allgemeinen eine andere Physiologie aufweisen als ihre Wildtyp-Geschwister, wodurch der direkte Vergleich von Knock-out-Tier und Wildtyp-Tier mit Vorsicht durchzuführen ist. Darüber hinaus ist es durchaus möglich, dass der Knock-out des NF-IL6-Gens in diesen Tieren durch eine andere Subklasse dieses Transkriptionsfaktors oder sogar andere, alternative Mechanismen kompensiert worden sein könnte, so dass nur ein „Teileffekt“ sichtbar wurde. Mit solchen Effekten ist bei genetisch modifizierten Tieren immer zu rechnen (Rummel et al., 2008). Eine kürzlich veröffentlichte Studie konnte so sogar zeigen, dass erst ein Doppel-Knock-out von NF-IL6 und einer zweiten Subklasse (hier CEBP β und zusätzlich CEBP ϵ) zu weiteren, dramatischen Veränderungen im Phänotyp führt (Akagi et al., 2010).

18.2. Stressinduzierte Erhöhung der motorischen Aktivität bei Ratten

Nachdem die Ratten aus ihrer gewohnten Umgebung herausgehoben und in das „open field“ überführt wurden, zeigten sie eine signifikant höhere motorische Aktivität als ihre Kontrolltiere. Die maximale Bewegungsaktivität konnte ab Beginn des Versuches bis 60 Minuten nach Versuchsbeginn gemessen werden und stimmte prinzipiell auch mit dem Zeitpunkt der Maximaltemperatur überein. Die Erkundung der neuen, unbekannten Umgebung spricht für eine Art Neugierde der Ratten. Aber das stattgefunden Vermeiden der Mitte des „open fields“ sowie das Bewegen der Tiere hauptsächlich entlang der Käfigbegrenzungen, zeigte auch eine durch die ungewohnte Umgebung ausgelöste Angst. Die erhöhte Defäkation und das Ausbleiben des Putzverhaltens war ein weiteres Anzeichen für eine bestehende Unsicherheit und verdeutlichte das Bestehen einer Stresssituation für die Ratten. Dies wurde auch in mehreren, früheren Studien beschrieben (Denenberg, 1969, Katz et al., 1981). In anderen Studien konnte die Expression von c-Fos (als Aktivitätsmarker für Neurone) in Gehirnregionen (Hypothalamus, Hippocampus, präfrontaler Cortex und die Amygdalae) nachgewiesen werden, die bei der Regulation von Emotionen und der Vermittlung einer adäquaten Antwort auf eine akute Stresssituation und damit auch einer

erhöhten motorischen Aktivität beteiligt sind (Honkaniemi et al., 1992, Kononen et al., 1992, Kabbaj and Akil, 2001). Willcox und Kollegen (1992) konnten zeigen, dass Vasopressin in den Amygdalae die motorische Aktivität beeinflussen kann (Willcox et al., 1992). Des Weiteren sind diese, als Teil des limbischen Systems, an der Entstehung von Emotionen, wie z. B. Angst, beteiligt (Tanaka et al., 2000). Auch für die Integration von afferenten Signalen des Immunsystems, assoziatives Lernen und kognitive Fähigkeiten sind die Amygdalae wichtig (Sah et al., 2003).

In der vorliegenden Arbeit konnten sowohl im PVN des Hypothalamus ($t = 90$ Minuten) als auch in der Hypophyse ($t = 30$ Minuten) nach Beginn des Open Field Stress Versuches NF-IL6-Signale detektiert werden. Das Maximum an Dichte und Stärke der Signale konnte zum Zeitpunkt $t = 90$ Minuten verzeichnet werden. Dies spricht erneut für eine Beteiligung des Transkriptionsfaktors NF-IL6 an der stressinduzierten Aktivierung der HPA-Achse. Sowohl die maximale Körperkerntemperatur als auch die maximale motorische Aktivität sowie schließlich auch die gemessenen IL-6-Konzentrationen im Plasma untermauern einen kausalen Zusammenhang der einzelnen Parameter und stützen die oben genannte Hypothese. Die immunhistochemisch detektierten NF-IL6-Signale zeigten darüber hinaus einen zu den anderen untersuchten physiologischen Parametern passenden zeitlichen Verlauf, da in der Hypophyse zum Zeitpunkt $t = 120$ Minuten die Anzahl der NF-IL6-immunreaktiven Zellen deutlich weniger wurde. Spätestens bei Versuchsende ($t = 240$ Minuten) war nur noch eine geringe Anzahl an NF-IL6-Signalen detektierbar. Interessanterweise konnte im PVN nach Open Field Stress keine Kolo-kalisation von NF-IL6-Signalen mit Endothelzellen festgestellt werden. Dies lässt auch darauf schließen, dass bei dieser stressinduzierten Aktivierung von NF-IL6 ein anderer Mechanismus vorliegen könnte, bei welchem die Endothelzellen des Hypothalamus und ihre ansonsten sehr wichtige Funktion als Signalvermittler eher eine untergeordnete Rolle spielen (Matsumura and Kobayashi, 2004). Darüber hinaus konnte in der vorliegenden Arbeit im SFO, als Beispiel eines sCVOs, kein stressinduzierter Anstieg der Anzahl und Dichte der NF-IL6-Signale verzeichnet werden. Dies lässt den Rückschluss zu, dass NF-IL6 in diesem Open Field Stress Versuch eher über einen neuronalen oder einen weiteren, alternativen Signalweg aktiviert wurde, da ansonsten z. B. IL-6 als humoraler Mediator eine erhöhte NF-IL6-Expression im SFO initiiert hätte, wie es für NF-IL6 (Damm et al., 2011) und auch schon für STAT3 in einer Vielzahl von Studien gezeigt werden konnte (Harré et al., 2002, Gautron et al., 2003, Harré et al., 2003, Rummel et al., 2004, Rummel et al., 2006).

18.2.1. Ein Vergleich der Ergebnisse bei Ratten mit den in NF-IL6-Knock-out-Mäusen erhobenen Befunden

In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal deutlich gezeigt werden, dass die NF-IL6-Knock-out-Mäuse, bei einer ähnlichen Grundaktivität, eine signifikant niedrigere lokomotorische Aktivität nach Beginn des Open Field Stress Versuches zeigten als die Wildtyp-Tiere. Zwar bewegten sich die defizienten Mäuse, verglichen mit ihrer eigenen Baseline nach Open Field Stress, signifikant mehr, allerdings mit einer um bis zu 50% reduzierten Bewegungsaktivität im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen. Dieser Befund

korrelierte mit dem sowohl niedrigeren als auch kürzeren, stressinduzierten Temperaturanstieg. Zusätzlich konnte zum ersten Mal in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass bei NF-IL6-Knock-out-Mäusen prinzipiell eine geringere lokomotorische Aktivität sowohl nach Saline-Injektion als auch nach systemischer LPS-Injektion (50 µg oder 2,5 mg/kg KGW) im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren vorlag (siehe Kapitel 15.1.2.). Es gibt nun verschiedene Möglichkeiten wie diese Befunde erklärt werden können. So wurde beschrieben, dass bei NF-IL6-defizienten Mäusen eine verringerte Fettakkumulation in weißem und braunem Fettgewebe vorliegt (Millward et al., 2007, Schroeder-Gloeckler et al., 2007, Staiger et al., 2009, Motyl et al., 2011). Das könnte bedeuten, dass bei diesen Tieren die Fähigkeit zur sog. „Nonshivering-Thermogenese“, die in spezialisierten, braunen Fettzellen stattfindet, verringert sein könnte. Das braune Fettgewebe kann, verglichen mit jedem anderen Organ, eine sehr hohe metabolische Leistung entwickeln und schützt unter anderem kleine Säugetiere (z. B. Ratten und Mäuse) vor dem Auskühlen (Sessler, 2008). Hinzu kommen bei diesen Mäusen Defekte sowohl in der Glykogenolyse als auch im Glukose- und Fettstoffwechsel, die auch in der Zucht zu einer erhöhten neonatalen Sterblichkeit (Croniger et al., 2001) führen. Darüber hinaus liegt eine unvollständige oder fehlerhafte Differenzierung von Hepatozyten (Diehl, 1998), Adipozyten (Darlington et al., 1998) und Neuronen (Taubenfeld et al., 2001) vor. Eine Studie von Carmona et al. (2005) hatte bestätigt, dass bei NF-IL6-Knock-out-Mäusen ein Unvermögen bzw. eine reduzierte Fähigkeit zur Mobilisierung von Fettsäuren für die Thermogenese in braunem Fettgewebe und somit eine gestörte Thermogenese vorliegt (Carmona et al., 2005). In den durchgeführten Untersuchungen konnte allerdings klar gezeigt werden, dass die Fieberreaktion bei thermoneutralen Temperaturen und der Stimulation mit einer niedrigen LPS-Dosis fast identisch zu den Wildtyp-Mäusen ist (Abbildung 15-1 und Abbildung 15-2). Demzufolge sind die NF-IL6-Knock-out-Mäuse zu einer kontrollierten Thermoregulation befähigt. Allerdings unterschied sich das Fieber nach Stimulation mit der hohen Dosierung nicht signifikant und war auch im Vergleich zu den mit Saline stimulierten Kontrolltieren nicht mehr signifikant. Zusammengefasst scheint es in diesen NF-IL6-Knock-out-Mäusen also dosisabhängig zu einer defizienten Fieberentstehung zu kommen, die prinzipiell nicht aufgrund einer defizienten Thermoregulation erklärbar ist.

Akuter Stress, sei es durch ein Open Field Experiment oder durch eine Infektion, führt bekanntermaßen, neben der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, zur Aktivierung der HPA-Achse und somit zu einer Mobilisierung von Energie sowie der Produktion von Corticosteroiden (Silverman et al., 2005). Diese üblicherweise benötigte, aber bei NF-IL6-Knock-out-Mäusen wahrscheinlich nicht vollständig mobilisierbare Energie, könnte eine mögliche Ursache für die signifikant reduzierte motorische Aktivität der Tiere sowohl nach LPS-Injektion als auch nach Open Field Stress darstellen. Auch die niedrigere Basaltemperatur und der kürzere und geringere Anstieg der Körperkerntemperatur der defizienten Mäuse nach einem Stressstimulus, könnten mit diesen Defekten im Fett- und Glukosestoffwechsel zusammenhängen. Dagegen spricht allerdings, wie bereits erwähnt, dass diese Tiere zu einer robusten Fieberreaktion in der Lage sind und stressinduziert ihre Aktivität erhöhen können („open field stress“).

Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass bei den NF-IL6-defizienten Tieren im Rahmen einer HPA-Achsen-Aktivierung eine verminderte stressinduzierte Synthese von IL-10 im Hypothalamus vorliegen könnte und dies in einer reduzierten motorischen Aktivität resultiert. NF-IL6 könnte im gesunden Individuum durchaus bei der Expression des IL-10-Gens beteiligt sein. Diese Vermutung steht in Übereinstimmung mit bereits publizierten Studien, die zeigen, dass eine icv.-Applikation von IL-10 zu einer erhöhten motorischen Aktivität führt (Nava et al., 1997) und in IL-10-defizienten Mäusen nach peripherer Stimulation mit LPS, neben einer Verlängerung der lethargischen Phase, lokomotorische Defizite und ein verschlechtertes lokomotorisches Lernverhalten beobachtet werden können (Krzyszton et al., 2008). Darüber hinaus führt zentral verabreichtes IL-10 nach systemischer LPS-Gabe zu einer Aufhebung von zuvor reduzierter sozialer Interaktion und Immobilität (Bluthe et al., 1999). Schließlich wird diese Hypothese dadurch untermauert, dass in neutrophilen Granulozyten von NF-IL6-defizienten Mäusen die Expression von IL-10 nach LPS-Gabe reduziert ist (Akagi et al., 2010). Außerdem besitzt NF-IL6 eine Bindungsstelle am IL-10 Promotor (Brenner et al., 2003, Akagi et al., 2008). Zusätzlich wurde eine LPS-induzierte und NF-IL6-vermittelte Expression von IL-10 beschrieben (Liu et al., 2006).

In den NF-IL6-Knock-out-Mäusen könnte also tatsächlich, neben verringerten Dopaminkonzentrationen, auch das Vorhandensein von zu geringen IL-10-Konzentrationen eine Rolle für die reduzierte motorische Aktivität spielen. Zusammengefasst stellt die beobachtete reduzierte lokomotorische Aktivität der NF-IL6-Knock-out-Mäuse sowohl nach einer Injektion (Saline oder LPS) als auch nach einem Open Field Stress Versuch, ein sehr interessantes Detail für die Funktion und Bedeutung des Transkriptionsfaktors dar und sollte in zukünftigen Studien bzw. bei der noch folgenden immunhistochemischen und molekularbiologischen Untersuchung der Gehirne tiefergehend analysiert werden.

Als ein anderer Anhaltspunkt für eine reduzierte, grundsätzliche Bewegungsaktivität, die vor allem in der Dunkelphase und somit in der aktivsten Phase der Mäuse sichtbar wurde, wäre eine durch die NF-IL6-Defizienz verursachte Veränderung in den Amygdalae denkbar. In früheren Studien konnte nach einer LPS-Stimulation in Neuronen des amygdaloiden Komplexes eine vermehrte Synthese von proinflammatorischen Zytokinen (TNF- α , IL-1 β und IL-6) festgestellt werden. Daneben korrelierte eine erhöhte Aktivität der Amygdalae mit dem Auftreten einer verstärkten Ängstlichkeit, einer verminderten motorischen Aktivität und einem reduzierten Erkundungsverhalten in einem „open field“ (Engler et al., 2011).

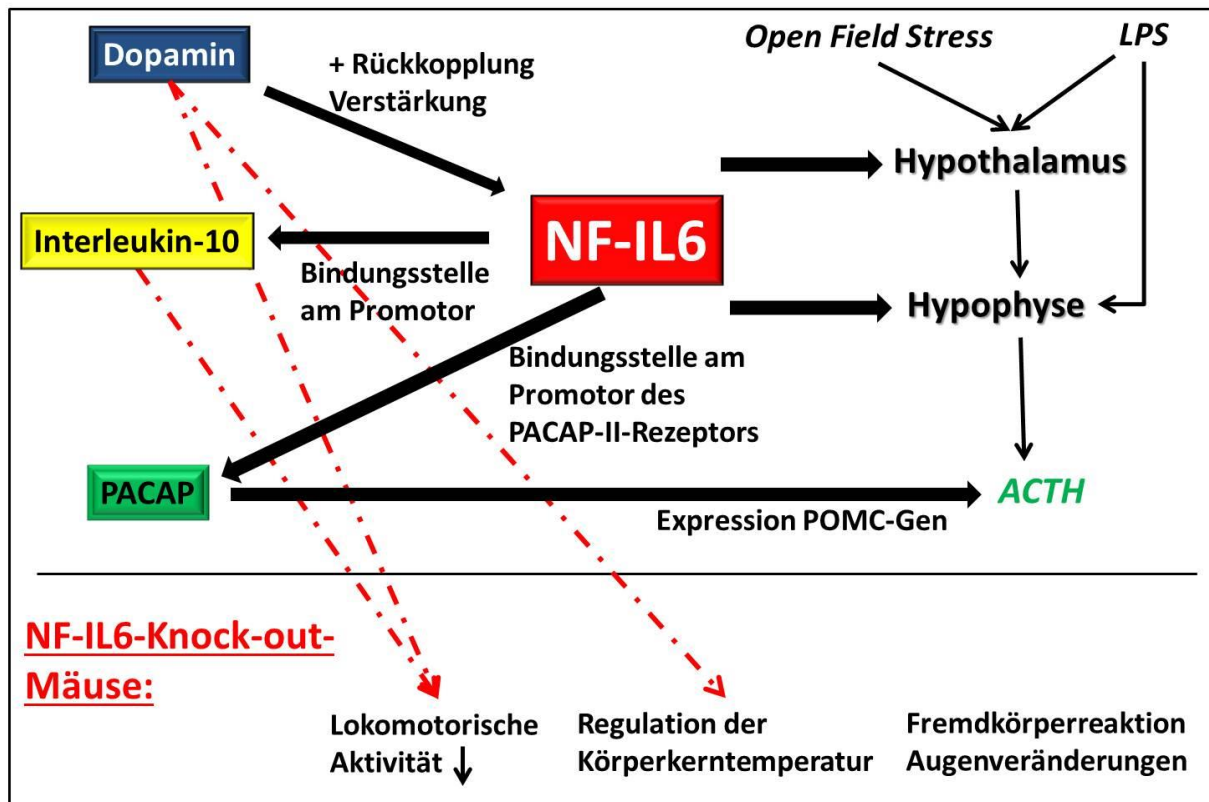


Abbildung 18-1

Zusammenfassende Darstellung der Bedeutung von NF-IL6 für die durch einen psychologischen oder inflammatorischen Stimulus aktivierte Hypothalamus-Hypophysen-Achse.

NF-IL6 wird sowohl auf der Ebene des Hypothalamus (PVN) als auch auf der Ebene der Hypophyse aktiviert und ist prinzipiell an der LPS-induzierten CRH- und ACTH-Synthese beteiligt. Des Weiteren ist NF-IL6 in der Lage eine erhöhte Expression des PACAP-Rezeptors-II zu induzieren.

PACAP erhöht sowohl über die Bindung an CRH-Neurone und corticotrope Zellen als auch über die Stimulation von FS-Zellen die Expression des POMC-Gens. Darüber hinaus ist NF-IL6 womöglich unter anderem über das antiinflammatorische Zytokin Interleukin-10 und Dopamin für die lokomotorische Aktivität von Bedeutung. Schließlich ist NF-IL6 womöglich auch über Dopamin an der Aufrechterhaltung bzw. Beendigung einer Fieberreaktion beteiligt. NF-IL6-defiziente Tiere zeigen sowohl nach LPS-Injektion als auch nach einem Open Field Stress eine verminderte motorische Aktivität und eine dosisabhängige Beeinträchtigung der Thermoregulation nach LPS-Injektion. Als sog. „Nebeneffekte“ der NF-IL6-Defizienz konnten eine gesteigerte Reaktion auf Fremdkörper als auch Veränderungen an den Augen beobachtet werden.

19. Weitere Auswirkungen des NF-IL6-Knock-outs auf die murine Thermoregulation

In der vorliegenden Arbeit entwickelten Wildtyp-Tiere, ähnlich zu den Ergebnissen aus früheren Studien (Rudaya et al., 2005), sowohl nach Injektion der niedrigen (50 µg/kg KGW i.p.) als auch der hohen Dosis (2,5 mg/kg KGW i.p.) LPS im Vergleich zur Injektion von physiologischer Kochsalzlösung ein Fieber. Zum einen konnte nach Injektion der niedrigen Dosis ein vierstündiger, signifikanter Temperaturanstieg verzeichnet werden und zum anderen entwickelte sich nach der Injektion der hohen Dosis ein signifikantes Fieber über den

gesamten Versuchszeitraum von 24 h mit Verlust des circadianen Rhythmus (Abbildung 15-1). Die Wildtyp-Mäuse zeigten dabei auch „sickness behavior“ mit reduzierter Futter- und Wasseraufnahme, Abnahme des Körpergewichts (Abbildung 15-6, A und B) sowie reduzierter motorischer Aktivität (Abbildung 15-3, Abbildung 15-4, Abbildung 15-5), wie bereits zuvor beschrieben wurde (Kent et al., 1992, Dantzer, 2001a, Dantzer et al., 2008). In der hier vorliegenden Studie konnte nun im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren zum ersten Mal die Fieberreaktion auch in NF-IL6-Knock-out-Mäusen untersucht werden. Sie zeigten nach Injektion der niedrigen Dosis eine Art „zweigeteiltes Fieber“ und ähnlich zu den Wildtyp-Tieren konnte eine dreistündige und signifikante Temperaturerhöhung nachgewiesen werden. Allerdings war zusätzlich nur in den NF-IL6-Knock-out-Mäusen auch eine zweite, zweistündige Erhöhung der Temperatur gegen Ende des Versuchszeitraumes zu beobachten. Damm und Kollegen (2011) hatten bereits früher eine Rolle bei der Aufrechterhaltung oder Beendigung von Fieber für NF-IL6 vermutet (Damm et al., 2011). Durch die neuen Ergebnisse kann nun hier diese Hypothese weiter als dosisabhängig differenziert werden. Trotzdem bleiben diese Ergebnisse zu bestätigen, z. B. durch eine spezifische Hemmung von NF-IL6 im Gehirn, um mögliche Nebeneffekte der Knock-out-Mäuse auf den Stoffwechsel sowie mögliche Kompensationen ausschließen zu können.

Interessanterweise konnte nach Injektion der hohen LPS-Dosis nur am Ende des 24-stündigen Versuchszeitraumes ein sehr kurzer, aber signifikanter Temperaturanstieg verzeichnet werden (Abbildung 15-1). Das bedeutet, dass die Fieberentstehung bei den NF-IL6-defizienten Mäusen dosisabhängig unterdrückt wurde. Der circadiane Rhythmus nach Gabe der hohen LPS-Dosis war aber, wie bei den Wildtyp-Mäusen, aufgehoben. Dies könnte darauf hinweisen, dass NF-IL6 im Gehirn erst bei stärkeren, infektiösen Stimuli für die Entstehung und Aufrechterhaltung von Fieber wichtig ist und somit die von Damm et al. (2011) aufgestellte Hypothese nur unter bestimmten Bedingungen (LPS-Dosis-Abhängigkeit) richtig ist (Damm et al., 2011).

Obwohl die Fieberreaktion ähnlich ausfiel wie bei Wildtyp-Mäusen, zeigten die NF-IL6-defizienten Mäuse lediglich nach der Injektion der hohen LPS-Dosis eine signifikante Reduktion der Futter- und Wasseraufnahme (Abbildung 15-6, A) im Vergleich zu den Kontrolltieren. Dies stellt einen weiteren Hinweis dafür dar, dass NF-IL6 bei moderaten, systemischen Entzündungsreaktionen eine Rolle für die Entstehung von Krankheitssymptomen (Anorexie, Adipsie) spielen könnte. Dies ist allerdings eine neue Hypothese, die durch weitere Untersuchungen der veränderten Signalwege im Gehirn zu belegen bleibt. Bei der Gewichtsabnahme der Tiere ergab sich in keiner der behandelten Versuchsgruppen ein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen (Abbildung 15-6, B).

Wenn der Vergleich der Temperaturkurven nicht mehr innerhalb des eigenen Genotyps erfolgte, sondern der direkte Vergleich „Knock-out“ versus „Wildtyp“ durchgeführt wurde, waren nur nach der Injektion der niedrigen LPS-Dosis am Ende des Versuchszeitraumes signifikante Temperaturunterschiede feststellbar (Abbildung 15-2). Wahrscheinlich ist dies unter anderem auf eine hohe Variabilität in der Antwort der NF-IL6-Knock-out-Mäuse zurückzuführen. Diese Ergebnisse lassen, neben möglichen Effekten durch die bereits

diskutierten Besonderheiten der genetisch veränderten Mäuse, verschiedene Hypothesen zu, die im Folgenden näher erläutert werden sollen: durch bisherige Studien erschloss sich ein eindeutiger und auch dosisabhängiger Zusammenhang zwischen NF-IL6 und der Fieberreaktion im Rahmen einer Inflammation, da z. B. nach der Injektion einer hohen Dosis an LPS (1 mg/kg KGW) nach 24 h die Fieberreaktion der Versuchstiere noch nicht beendet war (Damm, 2012) und außerdem NF-IL6-Signale im Gehirn solcher stimulierten Tiere detektiert werden konnten (Szekely and Szelenyi, 1979, Steiner et al., 2009, Damm et al., 2011). Dies bestätigt auch frühere Studien, in denen für NF-IL6 eine Rolle in der späten Phase der APR vermutet wurde (Poli, 1998). Dabei rückt das endogene Pyrogen IL-6 als möglicher Aktivator von NF-IL6 in den Vordergrund, da die Konzentration dieses Zytokins während einer Fieberreaktion kontinuierlich ansteigt und dieses Zytokin möglicherweise das periphere Signal der Inflammation an das ZNS vermittelt (Roth et al., 1993, Cartmell et al., 2000). In diesem Zusammenhang könnte man vermuten, dass erst nach Applikation der hohen LPS-Dosis (2,5 mg/kg KGW) die Bedeutung von NF-IL6 sichtbar wird, da die Knock-out-Mäuse erst verspätet (8 h p.i.) eine Fieberreaktion zeigten. Es besteht durchaus die Möglichkeit, dass nach Applikation der niedrigen LPS-Dosis (50 µg/kg KGW) kompensatorische Mechanismen bzw. andere Transkriptionsfaktoren die Rolle von NF-IL6 übernommen haben und es dadurch zu einem Anstieg der Körperkerntemperatur kam. Dadurch konnte womöglich die eigentliche Funktion von NF-IL6 gar nicht „sichtbar“ werden. Ein weiterer, eigener Teilbefund untermauert die Ergebnisse von Damm et al. (2011), die eine potenzielle Rolle von NF-IL6 bei der Beendigung der LPS-induzierten Fieberreaktion vermuten lassen. Die Knock-out-Tiere zeigten, wie oben erwähnt, nach Gabe der niedrigen LPS-Dosis gegen Ende des Versuchszeitraumes nochmals einen kurzen, signifikanten Temperaturanstieg (Abbildung 15-1). Dies könnte tatsächlich auf eine mögliche Rolle von NF-IL6 in der Beendigung einer Fieberreaktion hinweisen.

Eine solche Funktion von NF-IL6 könnte auch im Zusammenhang mit der Synthese von antiinflammatorisch wirksamen Zytokinen (z. B. IL-10) stehen (Damm et al., 2011). Solche Immunmediatoren führen nämlich zu einer Reduktion der Synthese von proinflammatorischen Mediatoren wie IL-1 β , TNF- α , IL-6 und PGE₂ im Gehirn (de Waal Malefyt et al., 1991, Howard and O'Garra, 1992, Cassatella et al., 1993) und könnten als mögliche Ursache für den erneuten und späten Temperaturanstieg angesehen werden. Wie man bereits weiß, werden IL-1 β , IL-6, IL-10, COX-2 oder mPGES nach einer Stimulation mit LPS auf mRNA-Ebene induziert (Rivest, 2003) und werden außerdem als Zielgene von NF-IL6 diskutiert (Damm, 2012). Es bleibt nun eine endgültige molekularbiologische Analyse der Gehirne der verwendeten NF-IL6-Knock-out-Mäuse abzuwarten, um z. B. Aussagen über die zentralen IL-10-Werte im Hypothalamus treffen zu können. Als potenziell kompensatorisch wirkende Transkriptionsfaktoren kommen sowohl NF κ B als auch STAT3 in Frage. Im Allgemeinen kann nach systemischer Gabe von LPS parallel zur Fieberkurve eine steigende Immunreaktivität dieser Transkriptionsfaktoren beobachtet werden [NF κ B 1-2 h p.i. (Nadjar et al., 2003) und STAT3 3-4 h p.i. (Harré et al., 2002, Rummel et al., 2005)]. Des Weiteren wurde eine zeitlich aufeinander aufbauende Funktion dieser Faktoren für die Fieberentwicklung vermutet, da erst nach Absinken der Immunreaktivität der erstgenannten

Faktoren der Anstieg der NF-IL6-Immunreaktivität beginnt. Deshalb könnte durchaus ein Zusammenhang zwischen dem oben beschriebenen Verlauf der Fieberkurve und der voneinander abhängigen Funktion der einzelnen Transkriptionsfaktoren bestehen.

Darüber hinaus wurde für die vorliegende Arbeit nicht getestet, welche Effekte die Defizienz von NF-IL6 auf andere Transkriptionsfaktoren aus der CEBP-Familie haben könnte. Dies hätte nämlich unter anderem Auswirkungen auf die Produktion von pro- oder antiinflammatorischen Zytokinen und somit auch auf die LPS-induzierte Fieberreaktion sowie auf andere Symptome des „sickness behaviors“. Außerdem könnte eine Verschiebung der Ratio von der aktiven NF-IL6-Isoform LAP zur inhibitorischen Isoform LIP womöglich bei der „normalen“ Fieberantwort eine Rolle spielen und wäre nicht in NF-IL6-Knock-out-Mäusen, sondern durch weitere, entsprechende Versuche mit einer gezielten Überexpression oder Hemmung dieser Isoformen zu untersuchen.

19.1. Beobachtete „Nebeneffekte“ des NF-IL6-Knock-outs

Neben den oben beschriebenen Veränderungen in der Thermoregulation und bei der lokomotorischen Aktivität der NF-IL6-Knock-out-Mäuse, konnte nach Implantation des Radiotransmitters zur Aufzeichnung von Körperkerntemperatur und lokomotorischer Aktivität eine Art „Fremdkörperreaktion“ beobachtet werden. Diese, ausschließlich bei den NF-IL6-defizienten Tieren auftretende Auffälligkeit, zeichnete sich durch eine derbe, bindegewebige, mit Exsudat gefüllte und den Sender umgebene Kapsel aus. Es lag zu keinem Zeitpunkt ein Aszites vor und es bestand auch keine Verbindung zur Bauchhöhle. Das Exsudat enthielt vorwiegend eosinophile Granulozyten, was auf eine allergisch-hyperergische Reaktion auf den Radiotransmitter (dieser war mit einer speziell dafür entwickelten Paraffin-Legierung ummantelt) schließen lassen könnte. Diese Beobachtung ist ein weiterer Hinweis auf die deutliche Beeinflussung der adäquaten Reaktionsfähigkeit des Immunsystems durch die NF-IL6-Defizienz. Eine Störung bei der angeborenen und erworbenen Immunität wurde bereits 1995 von Screpanti et al. beschrieben (Screpanti et al., 1995). Zumindest scheinen die Knock-out-Mäuse zu einer verstärkten Fremdkörperreaktion zu neigen. Dies ist eine unerwartete und neue Beobachtung, die eine potenzielle Funktion von NF-IL6 bei der Limitation solcher Prozesse erwarten lässt. Durch eine zukünftige, umfangreiche Analyse von Ausstrichen des Exsudats sowie durch Untersuchungen zur Zusammensetzung der Kapsel, könnten weitere Hinweise auf die mögliche Ursache dieser Reaktion gefunden und dadurch ein weiteres Puzzleteil zur Bedeutung und Funktion von NF-IL6 in das Gesamtbild eingefügt werden.

Darüber hinaus waren die Knock-out-Mäuse bereits drei Wochen nach ihrer Geburt phänotypisch als Knock-out-Tier identifizierbar, da sie Veränderungen an den Augen zeigten, die auch bei Behandlung mit Augensalben bestehen blieben. Diese Veränderungen zeichneten sich zu Beginn durch das Vorhandensein einer kleinen Lidspalte und geringem, meist parallel auftretendem, serösem Augenausfluss aus. Es kam in einigen Fällen zu Eintrübungen und einem trockenen Auge. Trotz dieser Veränderungen waren die Tiere in der Lage sich im Käfig zu orientieren sowie uneingeschränkt Futter und Wasser aufzunehmen. Darüber hinaus zeigten sie ein unauffälliges Allgemeinbefinden.

Es bleibt in Zukunft zu spezifizieren bzw. durch eine genaue ophthalmologische Untersuchung zu diagnostizieren, welche Veränderungen an den Augen der defizienten Tiere vorlagen und welche Ursachen diese haben könnten. Danach sollte außerdem analysiert werden, ob diese Befunde spezifisch auf die NF-IL6-Defizienz zurückzuführen sind. Möglicherweise ist NF-IL6 an der Expression von für die physiologischen Funktionen der Kornea notwendigen Proteinen beteiligt oder spielt für die ungestörte Entwicklung der Epithelzellen der Kornea eine Rolle. Darüber hinaus könnte die Funktion der in der Kornea befindlichen und makrophagenähnlichen Langerhans-Zellen, die bei Entzündungen in die Kornea einwandern (Hamrah et al., 2003, Hamrah and Dana, 2007), durch die NF-IL6-Defizienz gestört sein. Dadurch wäre es möglich, dass die Augen der Mäuse über ein normales Maß hinaus empfindlich gegenüber einer ansonsten unproblematischen Mikroflora sind und zusätzlich eine reduzierte Fähigkeit zur Eindämmung von Entzündungen besitzen. Schließlich könnte dies zu einer Keratitis mit Augenausfluss sowie zu einem vermehrten Einwandern von Fibroblasten führen und somit die trockenen Augen erklären. Diese Vermutungen sollten in zukünftigen Studien Beachtung finden und weitergehend untersucht werden, um eine mögliche Rolle von NF-IL6 bei Augenerkrankungen zu bestätigen oder auszuschließen.

20. Aktivierung von NF-IL6 durch proinflammatorische Zytokine in der Hypophyse im Rahmen LPS-induzierter Entzündungen

In der Hypophyse werden sowohl während physiologischer Zustände als auch im Rahmen von LPS-induzierten Entzündungen, neben den klassischen Hormonen auch Zytokine und Wachstumsfaktoren gebildet sowie deren Rezeptoren exprimiert (Ray and Melmed, 1997). Darüber hinaus werden die Hypophysenzellen durch hypothalamische Releasing- bzw. Inhibiting-Peptide beeinflusst (Ray and Melmed, 1997). Die Hypophyse kann auto- und parakrin ihre eigene Funktion während einer Infektion bzw. systemischer Entzündungen beeinflussen und somit einen Beitrag zur Homöostase des Organismus beitragen (Renner et al., 1996). In der vorliegenden Arbeit fand eine besondere Fokussierung auf den Vorderlappen der Hypophyse statt, da der Hinterlappen funktionell gesehen dem Hypothalamus zugeordnet werden kann. Des Weiteren wurde das Hauptaugenmerk auf die Zytokine TNF- α , IL-1 β und IL-6 gelegt, um die wichtige Rolle dieser Mediatoren in der Kommunikation zwischen Immunsystem und endokrinem System weitergehend untersuchen zu können (Renner et al., 2009).

20.1. Synthese von TNF- α und IL-6 in der LPS-stimulierten Hypophyse

In der vorliegenden Arbeit konnte in der untersuchten primären Zellkultur des HVL gezeigt werden, dass sowohl eine LPS- als auch eine IL-1 β -Stimulation der Zellen zu einer erhöhten IL-6-Produktion und Freisetzung führte (Abbildung 14-2). Dies war bereits in mehreren Studien gezeigt worden (Spangelo et al., 1990a, Spangelo et al., 1990c, Spangelo et al., 1991). IL-6 gilt im Zusammenhang mit der neuroendokrinen Funktion der Hypophyse als wichtigstes Zytokin, deren Synthese in FS-Zellen des HVL unter anderem durch IL-1 β und TNF- α

gesteigert werden kann (Nash et al., 1992, Renner et al., 1998). Dadurch, dass sich auf FS-Zellen der TLR4 befindet und diese Zellen auch CD14 exprimieren können, ist eine direkte Stimulation durch LPS (+LBP-CD14-TLR4) möglich (Lohrer et al., 2000, Akira et al., 2001). Des Weiteren führte die LPS- bzw. IL-1 β -Stimulation in den für die vorliegende Arbeit durchgeführten Studien, zu einer Erhöhung der TNF- α -Konzentration im Überstand der Zellkultur (Abbildung 14-2). Mit Ausnahme des Nachweises von TNF- α -mRNA in der Hypophyse und im Hypothalamus nach einem LPS Stimulus (Gatti and Bartfai, 1993), konnte die Synthese von TNF- α durch Zellen des HVL in den bisher publizierten Studien nicht gezeigt werden. Interessanterweise führte die Präinkubation mit einem IL-6- bzw. einem IL-10-Antikörper zu einer nochmals höheren TNF- α -Konzentration im Überstand der Kultur (Abbildung 14-2). Diese Beobachtungen lassen Rückschlüsse auf die Interaktionen zwischen den einzelnen Zytokinen zu und geben einen Einblick in das während einer Entzündung vorliegende Zytokinmilieu. Es ist bereits bekannt, dass das von Monozyten und Makrophagen produzierte IL-6 die Produktion von TNF- α und IL-1 β hemmen kann, wodurch das im Allgemeinen als proinflammatorisch bezeichnete Zytokin, auch antiinflammatorische Eigenschaften innehaben kann (Tilg et al., 1994). Diese Form eines Feedback-Mechanismus ist durchaus auch im HVL vorstellbar und würde die Erhöhung der TNF- α -Konzentration durch den IL-6- bzw. IL-10-Antikörper erklären. Auch die hemmende Wirkung von IL-10 auf die LPS-induzierte Synthese von TNF- α , IL-1 β und IL-6 ist bereits bekannt (Fiorentino et al., 1991).

Von FS-Zellen freigesetztes IL-6 bindet an IL-6/gp130-Rezeptoren und wirkt somit parakrin über den JAK-STAT-Signalweg auf die corticotropen Zellen, was in einer POMC-Expression und ACTH-Freisetzung resultiert (Renner et al., 1998, Gloddek et al., 2001). Ob TNF- α bezüglich der ACTH-Freisetzung aus corticotropen Zellen des HVL stimulierende oder hemmende Eigenschaften besitzt, wird weiterhin kontrovers diskutiert. Rettori et al. (1989) zeigten bereits in einer *in vivo*-Studie, dass nach der Injektion (icv.) einer hohen TNF- α -Dosis (100 ng/ml) in den dritten Ventrikel von Ratten, eine signifikante Erhöhung der ACTH-Freisetzung beobachtet und diese durch einen Cyclooxygenase-Hemmer reduziert werden konnte (Rettori et al., 1989). Die *in vitro*-Studie von Milenkovic et al. (1989) unterstützt diese Hypothese, da auch hier die TNF- α -Gabe eine dosisabhängige Erhöhung der ACTH-Freisetzung aus corticotropen Zellen bewirkte, die allerdings nur mäßig durch einen Cyclooxygenase-Hemmer beeinflusst werden konnte (Milenkovic et al., 1989). Sharp et al. (1989) stellten fest, dass zwar eine intravenöse (iv.) TNF- α -Injektion in einer schnellen und signifikanten Erhöhung der ACTH-Konzentration resultierte, aber im Gegensatz dazu weder die icv.-Injektion noch die Verwendung von TNF- α in einer Zellkultur des HVL zu einer signifikanten Erhöhung der ACTH-Freisetzung führte (Sharp et al., 1989).

Den Studien, die TNF- α als ACTH-freisetzendes Zytokin ansehen, stehen wiederum andere Untersuchungen gegenüber, die in TNF- α einen Inhibitor der HPA-Achse sehen.

Kehrer et al. (1988) zeigten bereits sehr früh, dass zwar IL-1 α und β , aber nicht TNF- α in der Lage sind in einer Zellkultur des HVL eine ACTH-Freisetzung zu bewirken (Kehrer et al., 1988). Auch Gaillard und Kollegen (1990) beobachteten eine hemmende Wirkung von TNF- α , zwar nicht auf die basale, aber auf die stimulierte (mittels CRH bzw. Vasopressin)

Freisetzung von ACTH aus corticotropen Zellen des HVL (Gaillard et al., 1990). Deshalb wurde bei Patienten mit schwerem, septischen Schock auch ein Zusammenhang zwischen erhöhten, zirkulierenden TNF- α -Konzentration und einer erhöhten Mortalität vermutet, da dadurch eine adäquate Antwort der HPA-Achse verhindert wurde (Gaillard et al., 1990). Vor allem neuere Studien zeigten, dass eine Therapie mit TNF-Inhibitoren bei chronischen Entzündungen (z. B. rheumatoide Arthritis) die zuvor reduzierte Funktion der HPA-Achse (zu niedrige ACTH- und Cortisol-Konzentrationen im Vergleich zum Entzündungsstatus des Körpers) wiederherstellen konnte und somit den betroffenen Patienten eine schnelle Verbesserung der klinischen Symptomatik versprach (Straub et al., 2006, Atzeni et al., 2010). Da in der untersuchten primären Zellkultur ausschließlich Zellen des HVL kultiviert wurden, stellt sich nun die Frage aus welcher Quelle das gemessene TNF- α des Überstandes stammen könnte. In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal immunhistochemisch gezeigt werden, dass die agranulären FS-Zellen nach LPS-Stimulation positiv für TNF- α waren (Abbildung 14-4). Für Makrophagen wurde bereits nachgewiesen, dass diese nach LPS-Stimulation sowohl IL-6 als auch TNF- α produzieren, welche dann zeitlich versetzt und über zwei verschiedene Wege freigesetzt werden können (Manderson et al., 2007). Das neugebildete TNF- α akkumuliert im sog. trans-Golgi-Netzwerk (TGN) bevor es in ein sog. Recycling Endosom verbracht und so schließlich zur Plasmamembran transportiert wird (Lieu et al., 2008). Das synthetisierte IL-6 gelangt ebenfalls aus dem Golgi-Komplex zu einem Recycling Endosom, um dann jedoch an der Plasmamembran als lösliches Protein freigesetzt zu werden (Manderson et al., 2007). Das heißt, dass diese beiden Zytokine entweder einzeln oder zusammen den Golgi-Komplex verlassen und dann in ein Recycling Endosom gelangen. Dort erfolgt eine Art „Sortierung“ und der darauffolgende Transport an die Zelloberfläche. Im Gegensatz zu IL-6 wird TNF- α meist zu sog. „phagocytic cups“ transportiert (Manderson et al., 2007). Diese Beobachtungen unterstützen die Hypothese der vorliegenden Arbeit, dass möglicherweise ein ähnlicher Mechanismus in FS-Zellen des HVL eine überlappende Synthese und zeitlich versetzte Freisetzung von IL-6 und TNF- α ermöglichen könnte. Dies gilt es in zukünftigen Studien zu überprüfen, indem sowohl in immunzytochemischen als auch in immunhistochemischen Untersuchungen ein sog. „triple labeling“ die gleichzeitige Anwesenheit sowohl von TNF- α als auch von IL-6 in s100-Protein-positiven Zellen des HVL bestätigt. Es bleibt anzumerken, dass dabei auch Kontrollen mit Präimmunseren angefertigt werden müssen, um eine mögliche Kreuzreaktion unter den Antikörpern auszuschließen. Eine weitere Möglichkeit wäre eine PCR-Analyse der Zellkulturzellen des HVL, wobei bei diesem Verfahren nicht auf einen speziellen Zellphänotyp geschlossen werden kann, sondern nur zwischen LPS- bzw. PBS stimulierten Proben unterschieden und die vorhandene Menge an IL-6 bzw. TNF- α mRNA verglichen werden könnte.

20.2. Aktivierung von NF-IL6 und anderen Transkriptionsfaktoren im Zytokinemilieu des HVL

In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass eine Stimulation von Zellkulturen des HVL mit LPS im Vergleich zur PBS-Stimulation zu einer verstärkten

Immunreaktivität von NF-IL6 im Nukleus führt (Abbildung 14-3). Interessanterweise war der Großteil der NF-IL6-exprimierenden Zellen auch TNF- α -positiv. Diese Ergebnisse lassen die Hypothese zu, dass NF-IL6 womöglich an der LPS-induzierten TNF- α -Produktion im HVL beteiligt sein könnte. Darüber hinaus resultierte eine Präinkubation mit einem IL-6 bzw. IL-10-Antikörper in einer zusätzlichen Steigerung der Anzahl und Intensität der NF-IL6-Signale mit gleichzeitiger TNF- α -Exprimierung (Abbildung 14-3). Es wird daher angenommen, dass auch hier eine sonst stattfindende Hemmung (negativer Feedback-Mechanismus) der TNF- α -Synthese durch IL-6 bzw. IL-10 ausblieb und somit eine verstärkte Aktivierung von NF-IL6 und die damit verbundene TNF- α -Freisetzung beobachtet werden konnte. Diese Vermutung wird durch weitere Studien unterstützt, in denen bei der Untersuchung von peripheren Geweben und von Makrophagen gezeigt werden konnte, dass NF-IL6 an den Promotor von TNF- α (Pope et al., 1994a, Liu et al., 2000) sowie des TNF- α -Rezeptors 1 (Bristol et al., 2009) und IL-6 (Akira et al., 1992) binden kann und somit an deren Expression beteiligt ist.

Des Weiteren konnte in der vorliegenden Arbeit durch die durchgeführten immunzytochemischen Untersuchungen gezeigt werden, dass eine LPS-Stimulation im Vergleich zur Kontrolle zu einer erhöhten Anzahl an ACTH-positiven Zellen führte (qualitativ und quantitativ). Eine Auszählung, der in der Immunzytochemie als ACTH-positiv detektierten Zellen, bekräftigte zusätzlich die oben beschriebenen Ergebnisse für die vorliegende Arbeit (Abbildung 14-8). Dies bestätigt außerdem frühere Untersuchungen einer LPS-stimulierten, erhöhten Freisetzung von ACTH in solchen Kulturen (Gloddek et al., 2001). Interessanterweise führte die vorherige Entfernung von IL-10 aus dem Zytokinmilieu mittels Antikörper zu einer zusätzlichen Erhöhung der Anzahl von ACTH-positiven Zellen bzw. deren Immunreaktivität. Im Gegensatz dazu, ergab die vor der LPS-Stimulation vorgenommene Entfernung von IL-6, eine starke Reduktion der Anzahl an ACTH-positiven Zellen (Abbildung 14-7). Diese Beobachtungen untermauern die bestehende Hypothese, dass IL-6 die Produktion von ACTH in corticotropen Zellen stimulieren kann (John and Buckingham, 2003, Renner et al., 2009). Dahingegen muss die Rolle von IL-10 kontrovers diskutiert werden, da bisher eine stimulierende Wirkung von IL-10 auf die ACTH-Freisetzung postuliert wurde (Hughes et al., 1994, Smith et al., 1999). In der vorliegenden Arbeit konnte allerdings eine Steigerung der Anzahl an ACTH-positiven Zellen nach Entfernen von IL-10 aus dem Zytokinmilieu und der darauffolgenden Stimulation mit LPS verzeichnet werden. Es besteht die Möglichkeit, dass die Reduktion der IL-10-Konzentration in der Phase der Präinkubation einen Anstieg von IL-1 β , TNF- α und IL-6 zur Folge hatte und dies in Kombination mit der darauffolgenden LPS-Stimulation ausreichte, um einen Anstieg der Anzahl der ACTH-positiven Zellen zu bewirken. Nach dem Einsatz eines TNF- α -Antikörpers konnten kaum Veränderungen in der Anzahl der ACTH-positiven Zellen festgestellt werden. Die Rolle von TNF- α in der Stimulation der ACTH-Produktion nach LPS-Stimulation könnte also limitiert sein. Offensichtlich scheint dieses Zytokin in unterschiedlichen Zusammenhängen (LPS, CRH oder nur TNF- α) verschiedene Wirkungen in der Hypophyse zu erzielen und bleibt weiterhin zu untersuchen.

Abschließend kann zusammengefasst werden, dass auf Ebene der Hypophyse IL-1 β und IL-6 eine deutliche ACTH-Antwort hervorrufen [IL-1 β : (Koenig et al., 1990) und IL-6: (Spangelo

et al., 1990b)], wohingegen TNF- α möglicherweise nicht direkt daran beteiligt ist, sondern sich weiterer Mediatoren bedient, um eine gesteigerte ACTH-Freisetzung zu bewirken. Darüber hinaus ist IL-1 β ein potenter Stimulator der IL-6-Freisetzung aus den FS-Zellen (Spangelo et al., 1991). IL-10 scheint ebenfalls eher indirekt über seine Wirkung auf die Hemmung der IL-6 Produktion zu wirken. Insgesamt ist es aber schwierig eine abschließende Beschreibung der Rolle dieses antiinflammatorischen Zytokins zu geben. Aufgrund seiner entzündungshemmenden Eigenschaften und den bisher publizierten Studien, die IL-10 eine dem ACTH sehr ähnliche Wirkung nachsagen [beide hemmen die Synthese von Interferon- γ (IFN γ)] (Johnson et al., 1984, Fiorentino et al., 1989), sollte in zukünftigen Studien z. B. mittels RIA eine Messung der tatsächlichen Menge an ACTH im Überstand der Zellkultur stattfinden. Dadurch könnte unter anderem eine genauere Aussage über die Wirkung der einzelnen Zytokine und im Speziellen von IL-10 getroffen werden.

In einer Studie von Mehet et al. wurde vermutet, dass NF κ B nicht nur in den FS-Zellen des HVL an der LPS-induzierten Freisetzung von IL-6 beteiligt ist und somit zu einer verstärkten ACTH-Freisetzung beiträgt, sondern auch einen essenziellen Bestandteil eines inhibitorischen Signalweges in den corticotropen Zellen darstellt, welcher durch LPS aktiviert und zu einer Hemmung der ACTH-Freisetzung führen kann (Mehet et al., 2012). Das bedeutet, dass NF κ B im HVL in zwei verschiedenen Zelltypen eine gegenteilige Wirkung besitzen könnte. Damit würde zum einen zu Beginn einer Infektion noch vor der CRH-Wirkung eine ausreichende ACTH-Freisetzung über IL-6 gewährleistet werden und zum anderen zu späteren Zeitpunkten eine überschießende Aktivierung der Hypophyse und somit der ACTH-Produktion verhindert werden (Mehet et al., 2012). Auch Karalis und Kollegen (2004) hatten bereits beobachtet, dass eine Erhöhung der POMC-Expression in den corticotropen Zellen durch CRH mit einer Hemmung der NF κ B-Bindungsaktivität einhergeht (Karalis et al., 2004). Dies würde bedeuten, dass bei der Anwendung von NF κ B-Inhibitoren (z. B. zur Behandlung einer rheumatoiden Arthritis) eine Beeinflussung der HPA-Achsen-Funktion als möglicher Nebeneffekt bedacht werden muss (Mehet et al., 2012). Die mögliche inhibitorische Rolle von NF κ B in corticotropen Zellen des HVL sollte in zukünftigen Studien weitergehend untersucht werden, um so zum einen mögliche Nebeneffekte der Therapie mit NF κ B-Inhibitoren zu verifizieren und möglichst vermeiden zu können sowie zum anderen ein besseres Verständnis für die Bedeutung von Transkriptionsfaktoren in der LPS-induzierten Aktivierung der HPA-Achse zu erreichen.

Ein weiterer Fokus sollte auf das „Zusammenspiel“ von FS-Zellen und corticotropen Zellen gelegt werden, um die mögliche Bedeutung verschiedener Signalwege (z. B. NF κ B oder NF-IL6-abhängig) in der Hypophyse für eine adäquate Reaktion der HPA-Achse im Rahmen einer Infektion aufklären zu können.

20.2.1. Beteiligung des JAK-STAT-Signalwegs an der NF-IL6-Aktivierung

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass eine Vorbehandlung der Zellen der primären HVL-Zellkultur mit dem JAK-2-Inhibitor AG490 und die darauffolgende LPS-Stimulation im Vergleich zu einer Cremophor-LPS-Behandlung zu einer mäßigen Reduktion der Anzahl der NF-IL6-positiven Zellen führte (Abbildung 14-5). Die TNF- α -

Konzentration im Überstand hingegen wurde durch AG490 deutlich reduziert. Dieser Teilbefund steht in Übereinstimmung mit der bereits beobachteten Reduktion von TNF- α im Plasma von LPS-stimulierten Ratten durch AG490 (Ruetten and Thiemermann, 1997).

Das Lösungsmittel Cremophor schien einen Eigeneffekt zu besitzen und führte in Kombination mit der LPS-Gabe zu einer starken Stimulation der TNF- α -Freisetzung (Abbildung 14-6). Die Anzahl der ACTH-positiven Zellen war durch die Anwendung des Inhibitors reduziert. Der JAK-STAT3-Signalweg ist für die Untersuchung der Bedeutung und der Funktion von NF-IL6 in der Hypophyse von großer Wichtigkeit, da z. B. von FS-Zellen gebildetes IL-6 über diesen Signalweg in corticotropen Zellen zu einer erhöhten Expression des POMC-Gens führt (Gautron et al., 2003) und NF-IL6 womöglich im „cross talk“ mit STAT3 (Niehof et al., 2001) oder auch über die alternative MAPK („mitogen-activated protein kinase“)-Kaskade an dieser erhöhten Expression beteiligt sein könnte (Arzt, 2001). Dadurch, dass die NF-IL6-Expression und vor allem die TNF- α -Freisetzung durch die Anwendung von AG490 reduziert werden konnte, besteht die Hypothese, dass über eine Hemmung der JAK-2 die Signalkaskade am IL-6-Rezeptor der corticotropen Zellen im HVL unterbrochen wurde und eine erfolgreiche Hemmung der Signalkaskade „downstream“ der Januskinase stattgefunden hat. Die daraus zu ziehenden Rückschlüsse beinhalten sowohl eine Beteiligung von NF-IL6 an der LPS-induzierten TNF- α - und IL-6-Bildung in FS-Zellen als auch eine potenzielle Rolle von NF-IL6 in der LPS-induzierten ACTH-Synthese. Um die Wirkung von AG490 in den corticotropen Zellen des HVL weiter charakterisieren zu können, sollte neben NF-IL6 auch die Immunreaktivität von STAT3 untersucht werden, da die nukleäre Translokation dieses Transkriptionsfaktors auch durch AG490 beeinflusst werden kann. Allerdings sollte hierbei beachtet werden, dass die maximale Immunreaktivität früher als bei NF-IL6 zu erwarten ist (Gautron et al., 2002, Rummel et al., 2004) und deshalb ein anderer Untersuchungszeitpunkt als 6 h nach der LPS-Stimulation gewählt werden sollte. Darüber hinaus könnte eine zukünftige PCR-Analyse der Gehalte an NF-IL6-, STAT3-, POMC- und TNF- α -mRNA nach AG490-Behandlung weitere Hinweise auf die NF-IL6-abhängigen Signalwege in Zellen des HVL geben sowie tiefergehende Zusammenhänge zwischen LPS-induzierter NF-IL6-Aktivierung und der damit verbundenen ACTH- und TNF- α -Freisetzung aus Zellen des HVL aufzeigen.

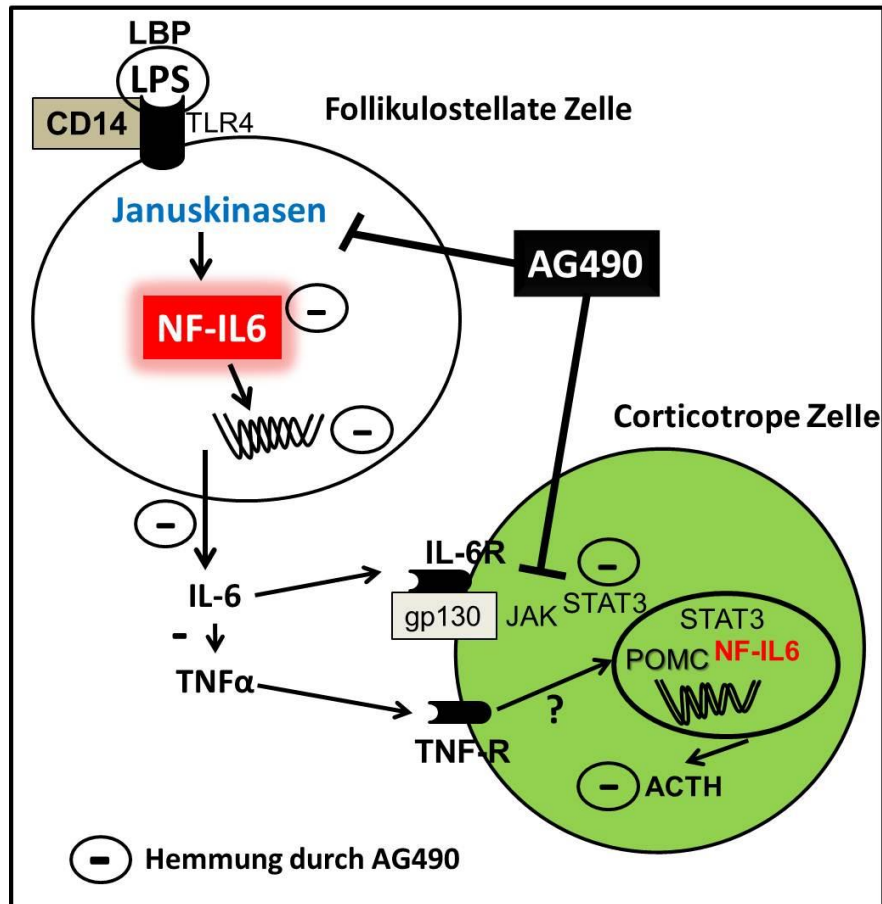


Abbildung 20-1

Schematische Darstellung der Wirkung des JAK-STAT-Inhibitors AG490 im Vorderlappen der Hypophyse.

AG490 inhibiert die für die Aktivierung des Signalwegs notwendigen Januskinasen und hemmt dadurch die verstärkte Expression von NF-IL6 durch die LPS-Stimulation. Dies hat eine Hemmung der vermehrten Expression der Zielgene zur Folge und resultiert in einer reduzierten TNF- α - und IL-6-Synthese durch die FS-Zelle. Das hat wiederum Auswirkungen auf die IL-6 bzw. TNF- α -induzierte ACTH-Synthese. Zusammengefasst führt also die Behandlung der HVL-Zellen mit AG490 zu einer nicht vollständigen Reduktion der NF-IL6-Expression, zu einer deutlichen Abnahme der TNF- α -Konzentration und womöglich auch zu einer reduzierten IL-6-Konzentration (nicht untersucht) im Überstand der primären Zellkultur. Dies hat wiederum eine verminderte ACTH-Produktion in den corticotropen Zellen des HVL zur Folge.

21. Fazit und Ausblick

Zusammenfassend kann durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auf eine wichtige Rolle des Transkriptionsfaktors NF-IL6 in der LPS- und auch stressinduzierten Kommunikation zwischen Immunsystem, zentralem Nervensystem und endokrinem System geschlossen werden. Es konnten abschließend folgende Hypothesen formuliert werden:

1. NF-IL6 ist an der LPS-induzierten humoralen Signalweiterleitung im Bereich der Circumventrikulären Organe und dem Gehirndothel beteiligt und wirkt somit an der Entstehung von Fieber und weiteren zentralnervös kontrollierten Krankheitssymptomen mit. Dieser Zusammenhang scheint spezieübergreifend von Bedeutung zu sein (Ratte und Maus).
2. NF-IL6 ist sowohl an der LPS-induzierten als auch an der stressinduzierten Aktivierung der HPA-Achse beteiligt und ist sowohl auf der Ebene des Hypothalamus (PVN) als auch auf der Ebene der Hypophyse von Bedeutung. Dabei wirken Endothelzellen, perivaskuläre Makrophagen und Pituizyten in der Hypophyse an der Signalweiterleitung von peripheren Immunstimuli mit.
3. Eine Sonderstellung nehmen perivaskuläre Makrophagen ein, da sie nicht nur durch einen LPS-Stimulus, sondern auch nach einem Stressstimulus in der Hypophyse aktiviert werden.
4. In der Hypophyse scheinen im Allgemeinen Januskinasen und im Speziellen der JAK-STAT3-Signalweg für die Vermittlung des IL-6-Signals und somit für die Aktivierung von NF-IL6 in corticotropen Zellen von besonderer Wichtigkeit zu sein.
5. In diesem Zusammenhang spielt die NF-IL6-Expression eine Rolle in der LPS-induzierten ACTH-Freisetzung aus corticotropen Zellen des HVL.
6. Der JAK-STAT-Inhibitor AG490 hemmt die LPS-induzierte NF-IL6-Expression nur mäßig, führt allerdings in diesem Zusammenhang nicht nur zu einer deutlichen Reduktion der TNF- α -Synthese, sondern auch zu einer Erniedrigung der Anzahl der ACTH-positiven Zellen im HVL.
7. Die Zytokine TNF- α , IL-1 β und IL-6, die alle in der Hypophyse selbst synthetisiert werden können, und auch IL-10, beeinflussen sich sowohl synergistisch als auch antagonistisch und tragen somit auch zur adäquaten Reaktion der Hypophyse auf infektiöse oder stressinduzierte Stimuli bei. Die LPS-induzierte Freisetzung von ACTH aus corticotropen Zellen wird durch IL-1 β und IL-6 gefördert bzw. durch IL-10 gehemmt.
8. In FS-Zellen des HVL steht die NF-IL6-Expression im Zusammenhang mit der LPS-induzierten Freisetzung von IL-6 und TNF- α .
9. NF-IL6 kann im HVL sowohl mit NF κ B als auch mit STAT3 interagieren („cross talk“), wodurch die Expression von Zielgenen (z. B. IL-6 oder POMC) synergistisch gesteigert oder antagonistisch gehemmt werden kann.

10. NF-IL6-Knock-out-Mäuse zeigen, neben einer übersteigerten Immunreaktion auf Fremdkörper, auch potenziell autoimmune oder immundefiziente Geschehen im Bereich der Kornea der Augen.
11. Eine NF-IL6-Defizienz hat nicht nur Auswirkungen auf die Thermoregulation, sondern auch auf die motorische Aktivität und beeinflusst das Verhalten der Tiere in Stresssituationen. Dabei ist die Bedeutung von NF-IL6 sowohl für die Fieberentstehung als auch für die Symptome des „sickness behaviors“ abhängig von der Dosis des inflammatorischen Stimulus LPS. NF-IL6 ist bei einer niedrigen LPS-Dosis an der entstehenden Anorexie und Adipsie sowie der Beendigung einer Fieberreaktion beteiligt, hingegen bei einer hohen LPS-Dosis an der Entstehung von Fieber.

Die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse demonstrieren, dass eine intensive Untersuchung der HPA-Achse und die detaillierte Aufklärung von Signalwegen und funktionellen Zusammenhängen mit einzelnen, beteiligten Komponenten wie z. B. des Transkriptionsfaktors NF-IL6 auch in Zukunft von großer Wichtigkeit sein werden. Die immer weiter steigende Anzahl an Erkrankungen (z. B. Depressionen), die mit Stress und damit verbundenen Veränderungen im Lebensstil (Ernährung, Schlafrhythmus, körperliche Aktivität) in Verbindung gebracht werden können, sind meist auf erworbene Beeinträchtigungen des neuroendokrinen Systems (HPA-Achse) zurückzuführen (Frodl and O'Keane, 2013, Lopresti et al., 2013). Das gestörte Gleichgewicht zwischen der neuroendokrinen, hormonellen sowie immunologischen Kommunikation hat wiederum Auswirkungen auf eine adäquate Reaktion des Immunsystems bei Infektionen und Entzündungen und ebnet somit häufig den Weg für Autoimmunerkrankungen wie z. B. Rheuma (Jara et al., 2006). Besondere Beachtung sollten neben den Transkriptionsfaktoren (z. B. NF-IL6) auch Zytokine wie TNF- α , IL-1 β und IL-6 finden, da sie zukünftig vor allem in therapeutischen Verfahren an Bedeutung gewinnen werden. Die Verwendung von Versuchstieren z. B. mit einem Knock-out für bestimmte Zytokinrezeptoren könnte in diesem Zusammenhang hilfreich sein, um die Rolle von NF-IL6 und die Auswirkungen einer solchen „Rezeptor-Defizienz“ z. B. in der HPA-Achse weitergehend untersuchen zu können. Auch LIP, die antiinflammatorisch wirksame Isoform von NF-IL6 sollte in zukünftigen Studien näher charakterisiert werden, um dieses entzündungshemmende Potenzial z. B. in der Therapie von Erkrankungen nutzen zu können, die durch eine überschießende Reaktion des Immunsystems gekennzeichnet sind.

Um die Rolle von NF-IL6 in der Thermoregulation sowie in der lokomotorischen Aktivität während Stressreaktionen weitergehend analysieren zu können, sollten die Gehirne der NF-IL6-defizienten Mäuse mittels immunhistochemischer und molekularbiologischer Verfahren untersucht werden. Dabei sollte der Fokus auf die entsprechenden thermoregulatorischen Zentren und die HPA-Achse gelegt werden. Abschließend könnten dadurch weitere wichtige Informationen zur Bedeutung von NF-IL6 im Komplex des „sickness behaviors“ gewonnen und somit weitere Lösungsansätze zur Vermeidung bzw. Inhibition solcher Symptome im Krankheitsgeschehen gefunden werden.

Die vorliegende Arbeit demonstriert, dass die Bedeutung von NF-IL6 besonders vielschichtig ist und verweist erneut auf die Komplexität in der Zusammenarbeit von Immunsystem, zentralem Nervensystem und endokrinem System. Die Beteiligung dieses Transkriptionsfaktors an den verschiedensten Mechanismen sowie auf den unterschiedlichsten Ebenen des ZNS bietet auch in Zukunft ein weites Feld für tiefergehende Forschungsvorhaben und macht Mut auf einen zukünftigen klinischen Nutzen der gewonnen Erkenntnisse.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Hintergrund und Zielsetzung der Arbeit

Mit der systemischen Injektion von Lipopolysaccharid [LPS, Zellwandbestandteil gram-negativer Bakterien und Mitglied der sog. PAMPS (Pathogen-assoziierte Molekülstrukturen)] kann bei Versuchstieren eine Entzündung nachgeahmt werden, die zentralnervös kontrollierte Krankheitssymptome wie Fieber und andere zum Komplex des sog. „sickness behavior“ gehörende Erscheinungen (Anorexie, Adipsie und Lethargie) zur Folge hat. Der gesamte Organismus reagiert mit der sog. Akute-Phase-Reaktion (APR), um pathogene Fremdmoleküle zu bekämpfen und die ursprüngliche Homöostase wiederherzustellen. Dabei agiert das Immunsystem nicht alleine, sondern als ein Bestandteil einer Gesamtheit, die das Überleben des Organismus gewährleistet. Das Immunsystem, das zentrale Nervensystem (ZNS) und das endokrine System ermöglichen über spezielle Botenstoffe die notwendige Kommunikation zwischen Peripherie und ZNS. Anhand der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren [z. B. NF κ B („nuclear factor kappaB“), STAT3 („signal transducer and activator of transcription 3“), NF-IL6 („nuclear factor for IL-6“)] lässt sich die genomische Aktivierung von Zellen innerhalb des ZNS nachweisen. Dies kann als eine Art „Endpunkt“ der Signalübermittlung von peripheren Immunsignalen an entsprechende regulatorische Zentren des ZNS angesehen werden. Im Zuge der APR kommt es auch zur Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HPA-Achse), die sich aus dem hypothalamischen CRH (Corticotropin-Releasing Hormon), dem hypophysären ACTH (Adrenocorticotropes Hormon) und dem Corticosteron bzw. Cortisol aus der Nebennierenrinde zusammensetzt und einer überschießenden proinflammatorischen Antwort des Immunsystems entgegenwirken soll. Der Transkriptionsfaktor NF-IL6, welcher zur Familie der CCAAT/Enhancer-bindenden Proteine gehört, ist im Gehirn in zahlreichen Zelltypen ein Aktivitätsmarker für längerfristige Entzündungsreaktionen und seine *de novo*-Synthese sowie Aktivierung wird unter anderem durch IL-6 (Interleukin-6), aber auch TNF- α (Tumornekrosefaktor- α) und womöglich IL-10 (Interleukin-10) initiiert. Dadurch erfolgt eine gesteigerte Expression seiner Zielgene, zu denen COX-2 (Cyclooxygenase-2), mPGES (mikrosomale Prostaglandin-E-Synthase), TNF- α und IL-10, aber auch CRH und POMC (Proopiomelanocortin) gezählt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die potenzielle Rolle von NF-IL6 sowohl in der LPS-induzierten als auch in der stressinduzierten HPA-Achse im Zusammenhang mit der Entstehung von Fieber und dem sog. „sickness behavior“ analysiert. Um einen weiteren Beitrag zur Bedeutung und Funktion von NF-IL6 als späten Zellaktivierungsmarker bei systemischen Entzündungen leisten zu können, erfolgte zusätzlich eine Untersuchung von mehreren physiologischen Parametern (Körperkerntemperatur, lokomotorische Aktivität, Futter- und Trinkwasseraufnahme, Entwicklung des Körpergewichts) bei NF-IL6-defizienten Mäusen.

Methodik

Die Gehirne der mit verschiedenen LPS-Dosen injizierten oder durch ein Open Field Stress Versuch stimulierten Ratten bzw. NF-IL6-Knock-out-Mäuse wurden vorwiegend für immunhistochemische, aber auch zum Teil für molekularbiologische Untersuchungen verwendet. Des Weiteren wurden bei den Ratten im Open Field Stress Versuch und bei den NF-IL6-defizienten Mäusen sowohl nach Open Field Stress Versuch als auch nach LPS-Injektion die physiologischen Parameter (Körperkerntemperatur, lokomotorische Aktivität, Futter- und Trinkwasseraufnahme) telemetrisch erfasst und ausgewertet. Plasmazytokine (TNF- α und IL-6) der Versuchstiere wurden mittels Bioassay analysiert. Darüber hinaus erfolgte die Untersuchung von NF-IL6 im LPS-induzierten Zytokinmilieu einer primären Zellkultur des Hypophysenvorderlappens (HVL) von Ratten mittels verschiedener Zytokinantikörper und dem JAK-STAT-Inhibitor AG490.

Kernbefunde

Die Rolle von...

...NF-IL6 in der humoralen Signalweiterleitung an das ZNS

Zum ersten Mal konnte eine NF-IL6-Aktivierung 8 h nach einer LPS-Injektion (100 μ g/kg KGW) im Bereich der Circumventrikulären Organe [OVLT (*Organum vasculosum laminae terminalis*), SFO (*Organum subfornicale*), ME (*Eminentia mediana*)], in Zellen des SON (*Nucleus supraopticus*), in Gehirndothelzellen und im *Plexus choroideus* der Maus beobachtet werden. NF-IL6 scheint demzufolge spezieübergreifend (zusätzlich zur Ratte auch in der Maus) an der LPS-induzierten humoralen Signalweiterleitung beteiligt zu sein.

...NF-IL6 in der LPS-induzierten Hypothalamus-Hypophysen-Achse

Bei Ratten konnten NF-IL6-Signale in der LPS-induzierten (100 μ g/kg KGW) Hypothalamus-Hypophysen-Achse sowohl auf der Ebene des Hypothalamus (PVN) als auch auf der Ebene der Hypophyse detektiert werden. Der zeitliche Höhepunkt der Immunreaktivität von NF-IL6 lag bei 8 h *post injectionem* (p.i.). Im Rahmen dieser Arbeit konnten in der Hypophyse corticotrope Zellen, Endothelzellen, perivaskuläre Makrophagen, Pituizyten und Neuronenausläufer aus dem PVN als NF-IL6-positiv detektiert werden. Darüber hinaus waren zum Zeitpunkt 8 h p.i. im HVL die Transkriptionsfaktoren NF-IL6, NF κ B sowie STAT3 zum einen als singuläres Signal und zum anderen in Colokalisation (NF-IL6-NF κ B und NF-IL6-STAT3) anzutreffen. Entsprechend der vorliegenden Daten scheint NF-IL6 sowohl an der LPS-induzierten Weiterleitung peripherer Immunstimuli als auch an der LPS-induzierten Aktivierung der HPA-Achse und möglicherweise an der Synthese von ACTH beteiligt zu sein. Die Colokalisation aktivierter einzelner Transkriptionsfaktoren dürfte ein synergistisches bzw. antagonistisches Zusammenspiel („cross talk“) ermöglichen und damit die Expression bestimmter Zielgene (z. B. IL-6 oder POMC) in der Hypophyse beeinflussen.

...NF-IL6 in der stressinduzierten Hypothalamus-Hypophysen-Achse

Ein psychologischer Stressstimulus (Open Field Stress) bei Ratten führte nicht nur zu einer signifikanten Erhöhung der Körperkerntemperatur und einem signifikanten Anstieg der IL-6-Konzentrationen im Blut der Versuchstiere, sondern resultierte ähnlich dem infektiösen Stimulus (LPS-Injektion) in einer NF-IL6-Aktivierung im Hypothalamus (PVN) und in der

Hypophyse mit einem zeitlichen Höhepunkt bei 90 Minuten nach Stressbeginn. Im Gegensatz zur LPS-induzierten Aktivierung zeigten jedoch die Endothelzellen des PVN keine NF-IL6-Signale. In der Hypophyse nahmen die perivaskulären Makrophagen eine Sonderstellung ein, da sie als einziger identifizierter Zellphänotyp ein positives NF-IL6-Signal zeigten. Somit scheint NF-IL6 zwar an der Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Achse, aber nicht an der durch einen Open Field Stress aktivierten Synthese von ACTH in corticotropen Zellen direkt beteiligt zu sein. In weiteren Open Field Stress Versuchen konnte außerdem gezeigt werden, dass NF-IL6-defiziente Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren eine verringerte, stressinduzierte Erhöhung der Körperkerntemperatur aufwiesen. Dies belegt zum ersten Mal, dass NF-IL6 tatsächlich auch an psychologischen, stressinduzierten Reaktionen und damit wahrscheinlich an der Hypothalamus-Hypophysen-Achsen-Aktivierung beteiligt zu sein scheint. Eine solche, wahrscheinlich indirekte, Beteiligung von NF-IL6 wäre beispielsweise auch über PACAP („pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide“) denkbar, bleibt aber in weiterführenden Studien noch zu untersuchen.

...NF-IL6 in follikulostellaten und corticotropen Zellen einer primären Zellkultur des Hypophysenvorderlappens

Nach Stimulation der Zellen der primären Zellkultur mit LPS bzw. mit Interleukin-1 β (IL-1 β) konnten erhöhte Konzentration an IL-6 und TNF- α im Überstand gemessen werden, die durch die Anwendung verschiedener Antikörper (IL-6-, IL-10- und TNF- α -Antikörper) beeinflusst wurden. Dadurch konnte das Zusammenspiel der einzelnen Zytokine im Milieu des HVL und im Zusammenhang mit NF-IL6 näher untersucht werden, da Zytokine einen wesentlichen Beitrag zur adäquaten Reaktion der Hypophyse auf infektiöse oder stressinduzierte Stimuli leisten. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass NF-IL6 möglicherweise in der LPS-induzierten Synthese von TNF- α durch follikulostellatale Zellen, die auch IL-6 synthetisieren, eine wichtige Rolle spielt. Die LPS-induzierte NF-IL6-Immunreaktivität colokalisierte mit induzierter TNF- α -Immunreaktivität sowie erhöhten TNF- α -Konzentrationen in den Zellkulturüberständen. Des Weiteren wurden Hinweise dafür gefunden, dass IL-6 womöglich an der NF-IL6-vermittelten und verstärkten Expression des POMC-Gens in corticotropen Zellen und somit auch NF-IL6 an der erhöhten ACTH-Synthese nach LPS-Stimulation beteiligt ist. Die LPS-induzierte Immunreaktivität von ACTH in corticotropen Zellen wurde durch IL-6-Antikörper gehemmt und durch IL-10-Antikörper gefördert. IL-10, als antiinflammatorisches Zytokin, führte demnach über einen „negativen Feedbackmechanismus“ zu einer Inhibition sowohl der Synthese verschiedener Zytokine (IL-6) als auch der LPS-induzierten ACTH-Produktion in der Hypophyse. Die Anwendung des JAK-STAT-Inhibitors AG490 hemmte anteilig die LPS-induzierte NF-IL6-Expression und führte in diesem Zusammenhang nicht nur zu einer deutlichen Reduktion der TNF- α -Synthese, sondern auch zu einer Erniedrigung der Anzahl der ACTH-positiven Zellen im HVL. Dies deutet darauf hin, dass der JAK-STAT-Signalweg an diesen Prozessen (ACTH- und TNF- α -Synthese) beteiligt ist.

NF-IL6-Knock-out-Mäuse

Die verwendeten NF-IL6-Knock-out-Mäuse zeigten als Nebenbefund eine übersteigerte Immunreaktion auf Fremdkörper und Veränderungen im Bereich der Kornea.

Die Auswirkungen der NF-IL6-Defizienz auf die Thermoregulation äußerten sich nach der Injektion einer niedrigen LPS-Dosis (50 µg/kg KGW) in einer ähnlichen Fieberreaktion wie in Wildtyp-Tieren. Das Fieber stieg allerdings gegen Ende des Versuchszeitraumes (24 h) nur in den genetisch veränderten Tieren erneut signifikant an. Dies spricht für eine Bedeutung von NF-IL6 für die Beendigung einer Fieberreaktion. Des Weiteren entwickelte sich nach der Injektion einer hohen LPS-Dosis (2,5 mg/kg KGW) lediglich zwischen 23-24 Stunden ein kurzer signifikanter Fieberanstieg. Wildtyp-Tiere zeigten, neben einem völligen Verlust des Tag-Nacht-Rhythmus, über den gesamten Zeitraum von 24 Stunden eine signifikant erhöhte bzw. veränderte Körperkerntemperatur. Die Reaktion der Wildtyp-Mäuse war nach beiden LPS-Dosen von Anorexie und Adipsie begleitet, während NF-IL6-defiziente Tiere lediglich nach der hohen Dosis die oben genannten Symptome zeigten. Das heißt, dass die Bedeutung von NF-IL6 für die Fieberentstehung, aber auch für Symptome des „sickness behaviors“ (Anorexie, Adipsie) abhängig von der Dosis des inflammatorischen Stimulus LPS ist. Darüber hinaus konnte zum ersten Mal beobachtet werden, dass NF-IL6-Knock-out-Mäuse eine deutlich reduzierte motorische Aktivität im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren zeigten, sowohl nach LPS-Injektion als auch nach einem Open Field Stress, was womöglich mit Veränderungen in der Expression von IL-10 sowie Dopamin im Gehirn zusammenhängen könnte.

Schlussfolgerungen

Die vorliegende Arbeit zeigt zum einen die Vielschichtigkeit der Funktionen des Transkriptionsfaktors NF-IL6 und zum anderen die Komplexität der durch einen peripheren Immunstimulus (LPS) bzw. durch einen Stressstimulus (Open Field Stress) angestoßenen Kommunikationswege zwischen Immunsystem, zentralem Nervensystem und endokrinem System. Die potenzielle Rolle in der Aktivierung der HPA-Achse sowie bei der Entstehung von Fieber und zentralnervös kontrollierten Krankheitssymptomen, macht diesen Transkriptionsfaktor bei zukünftigen Untersuchungen langfristiger und vor allem anti-inflammatorischer Effekte zu einem wichtigen Untersuchungsgegenstand der (Psycho-) Neuroimmunologie. Da ein gestörtes Gleichgewicht zwischen der neuroendokrinen, hormonellen und immunologischen Kommunikation erhebliche Auswirkungen auf eine adäquate Reaktion des Immunsystems bei Infektionen und Entzündungen haben kann, stellt das diffizile Zusammenspiel von NF-IL6 und inflammatorischen Mediatoren einen wichtigen Anhaltspunkt für weitere Studien dar. Darüber hinaus besitzen zukünftige Untersuchungen ein großes Potenzial für die Entwicklung neuer Lösungsansätze im Hinblick auf therapeutische Möglichkeiten bei Krankheiten (z.B. Depressionen, rheumatische Erkrankungen sowie Krebs), deren wachsende Bedeutung auch in Zukunft die Bearbeitung weiterer Fragestellungen im Zusammenhang mit NF-IL6 erfordern werden.

VI. SUMMARY

Background and purpose

Systemic injection of the bacterial mimetic lipopolysaccharide [LPS, cell wall component of gram-negative bacteria and a member of the so-called pathogen associated molecular pattern (PAMPS)] induces inflammation in experimental animals, which is accompanied by brain controlled symptoms such as fever, anorexia, lethargy and adipsia, all of which are also termed „sickness behavior”. This so-called acute-phase-response (APR) helps the organism to eliminate pathogens and to restore the primary homeostasis. The immune system does not act as an individual, but as a part of an entity that ensures survival of the organism. The immune system, the central nervous system (CNS) and the endocrine system enable the necessary communication between the peripheral and the central nervous system. Genomic activation of cells within the CNS can be monitored by immunohistochemical detection of activated transcription factors [for example NF κ B (nuclear factor kappaB), STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3), NF-IL6 (nuclear factor for IL-6)] and is regarded as a kind of "end point" of the transmission of signals from the periphery to the regulatory centers in the CNS. In the course of the APR the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA axis) is activated, which consists of the hypothalamic CRH (corticotropin-releasing hormone) that induces the release of pituitary ACTH (adrenocorticotrophic hormone) and subsequently the release of corticosterone or cortisol from the adrenal cortex to counteract an excessive proinflammatory response of the immune system. The transcription factor NF-IL6, which belongs to the family of the CCAAT/enhancer-binding proteins, is a marker for inflammatory reactions at late or chronic stages in many cell types of the brain. Its *de novo*-synthesis and activation is primarily induced by IL-6 (Interleukin-6), but also by TNF- α (tumor necrosis factor α) and possibly by IL-10 (Interleukin-10) and results in an increased expression of several target genes, including COX-2 (cyclooxygenase-2), mPGES (microsomal prostaglandin E synthase), TNF- α and IL-10, but also CRH and POMC (proopiomelanocortin).

The potential role of NF-IL6 in LPS-induced as well as in stress-induced HPA axis activation was analyzed in the present study in the context of the development of fever and of so-called "sickness behavior". To further investigate the potential contribution and function of NF-IL6 as a late cell activation marker of systemic inflammation, several physiological parameters (core body temperature, locomotor activity, food and water intake, change in body weight) were analyzed in NF-IL6-deficient mice.

Experimental Approach

Rats and NF-IL-6-knock-out-mice were treated systemically with different doses of LPS or stimulated by an open field stress test and brains were analyzed using immunohistochemistry and RT-PCR. Moreover, physiological parameters (core body temperature, locomotor activity, food and water intake) were recorded by a telemetric system of rats stimulated in the

open field stress test, and of NF-IL6-deficient mice, which were similarly stressed or treated with LPS. Plasma cytokines (TNF α and IL-6) of animals were analyzed by a bioassay. In addition, the role of NF-IL6 in the LPS-induced cytokine milieu of a primary cell culture of the anterior pituitary of rats was investigated using various cytokine antibodies and the JAK-STAT inhibitor AG490.

Key Results

The role of...

...NF-IL6 in the humoral signaling pathway to the central nervous system

For the first time an activation of NF-IL6 was observed 8 hours after LPS-injection (100 μ g/kg) in the circumventricular organs [OVLT (*Organum vasculosum laminae terminalis*), SFO (*Organum subfornicale*), ME (*Eminentia mediana*)], in cells of the SON (*Nucleus supraopticus*), in endothelial cells of the brain and in the *choroid plexus* of the mouse. Thus, NF-IL6 seems to be involved in LPS-induced humoral signaling of both species, as previously shown in the rat but also in mice.

...NF-IL6 in the LPS-induced hypothalamic-pituitary axis

In the LPS-induced (100 μ g/kg) systemic inflammation NF-IL6 signals were detected at the level of the hypothalamus (PVN) as well as at the level of the pituitary gland of the activated hypothalamic-pituitary axis in the rat. The peak of NF-IL6-immunoreactivity was 8 hours after injection. In the pituitary, corticotropic cells, endothelial cells, perivascular macrophages, pituicytes and axons of neurons projecting from the PVN to the pituitary showed positive immunoreactivity for NF-IL6. Moreover, in addition to NF-IL6 other activated (nuclear translocated) transcription factors such as STAT3 and NF κ B were detected as singular signals and in colocalization (NF-IL6-NF κ B and NF-IL6-STAT3) in the anterior lobe of the pituitary. According to the present data, NF-IL6 might play a key role in the transmission of peripheral immune stimuli to the brain, in LPS-induced activation of the hypothalamic-pituitary axis and in the synthesis of ACTH. The colocalization of activated transcription factors should allow their synergistic or antagonistic interaction ("cross talk") and, thus, influence the expression of specific target genes (for example IL-6 or POMC) in the pituitary.

...NF-IL6 in the stress-induced hypothalamic-pituitary axis

A psychological stress stimulus (open field stress) in rats did not only induce a significant increase in core body temperature and a significant increase of plasma IL-6-levels but also resulted in NF-IL6-activation in the hypothalamus (PVN) and in the pituitary gland (temporal peak: 90 min) in a pattern and intensity similar to that seen after the infectious stimulus (LPS injection). In contrast to the LPS-induced activation of the HPA axis, endothelial cells of the PVN and pituitary did not show a positive NF-IL6-immunoreactivity while perivascular macrophages were the only identified cell phenotype in the pituitary, which were positive for NF-IL6. Thus, NF-IL6 seems to be involved in HPA axis activation by an open field stress, but does not directly contribute to the expression of ACTH in corticotropic cells. It was demonstrated in further open field stress experiments that NF-IL6-deficient mice show a reduced stress-induced increase in core body temperature compared to wild-type animals.

This demonstrates for the first time that NF-IL6 seems to participate in psychological stress-induced reactions and, therefore, is likely to be involved in the activation of the hypothalamic-pituitary axis. Such a probably indirect involvement of NF-IL6 in this process could be mediated through PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide) but remains to be explored in further studies.

...NF-IL6 in folliculostellate and corticotropic cells in a primary cell culture of the anterior pituitary

LPS- or Interleukin-1 β - (IL-1 β) stimulation induced increased IL-6 and TNF- α concentrations in the supernatant of primary cell cultures from the anterior lobe of the pituitary. Additional treatment with different antibodies (IL-6-, IL-10- and TNF- α -antibody) altered the concentrations of these cytokines. Using this experimental design, interactions of different cytokines in the LPS-induced cytokines milieu of the anterior lobe of the pituitary were investigated in detail. These cytokines play (in association with NF-IL6) an important role in the adequate response of the pituitary gland to infection or stress stimuli. It was shown that NF-IL6 might play an important role in the LPS-induced synthesis of TNF- α by folliculostellate cells, which subsequently also synthesize IL-6. LPS-induced NF-IL6-immunoreactivity colocalized with induced TNF- α -immunoreactivity and elevated TNF- α levels in cell culture supernatants. Furthermore, it was found evidence that IL-6 might be involved in a NF-IL6-mediated increased expression of the POMC gene in corticotropic cells and, thus, NF-IL6 might participate in the increased ACTH-synthesis after LPS stimulation. The LPS-induced ACTH-immunoreactivity of corticotropic cells was inhibited by an IL-6-antibody and enhanced by an IL-10-antibody. IL-10 is an anti-inflammatory cytokine, which probably caused an inhibition of the synthesis of various cytokines (IL-6) and the LPS-induced ACTH-production in the pituitary by a so-called "negative feedback" mechanism. In addition, application of the JAK-STAT inhibitor AG490 moderately inhibited LPS-induced NF-IL6-expression and led to a significant reduction of TNF- α -synthesis that was accompanied by a decrease in the number of ACTH-positive cells. Thus the JAK-STAT signaling pathway seems to be involved in the process of ACTH- and TNF- α -synthesis.

NF-IL-6 knock-out mice

Apart from the primary scope of the present study an exaggerated immune response of NF-IL6-knockout mice to foreign bodies and some alterations in the cornea of their eyes were observed. After the injection of a low dose of LPS (50 μ g/kg) NF-IL6 deficient animals showed a similar fever to wild-type mice. However, towards the end of the study period (24 h) a second significant increase in the febrile response was observed only in the genetically modified animals. This is indicative for a potential role of NF-IL6 in the termination of the febrile response. Moreover, NF-IL6-knock-out mice only developed a brief but significant rise in temperature between 23-24 hours after the injection of a high dose of LPS (2.5 mg/kg). LPS-stimulated (high dose) wild-type animals showed significantly increased or altered core body temperature throughout the entire 24-hour period beside a complete loss of their circadian rhythm. In addition, both LPS doses induced anorexia and adipsia in these mice, while NF-IL6-deficient animals only showed these symptoms after the high dose of LPS. These results demonstrate that the importance of NF-IL6 for the generation of fever and other

symptoms of "sickness behavior" (anorexia, adipsia) depends on the dose of the inflammatory stimulus LPS. Importantly, it was observed for the first time that NF-IL6-knock-out mice show a significantly reduced motor activity compared to wild-type animals, both after LPS injection and after an open field stress, which possibly may be linked to changes in the expression of IL-10 and dopamine in the brain.

Conclusions

On the one hand, the present study shows the multiple functional facets of the transcription factor NF-IL6 and, on the other hand, the complexity of the communication between the immune system, the central nervous system and endocrine system initiated by peripheral immune stimuli (LPS) or by stress (open field stress). The potential role of NF-IL6 in the activation of the HPA axis and in the generation of fever and brain controlled sickness symptoms point to the fact that this transcription factor will be an important target in further investigations about long-term and especially anti-inflammatory effects. Thus, NF-IL6 will be an important research object for (psycho-) neuroimmunology research. Since imbalances between the endocrine, hormonal and immunological communication exhibit significant impact on an adequate immune response during infection and inflammation, the delicate interplay of NF-IL6 and inflammatory mediators remains an important field for further studies. Overall future studies on NF-IL6-related questions will have great potential to develop new therapeutic approaches for diseases that are of growing importance including depression, rheumatism and cancer.

VII. ABKÜRZUNGEN

ACTH	Adrenocorticotropes-Hormon	ds	double-stranded
ARC	<i>Nucleus arcuatus</i>	DTT	Dithiothreitol
AG490	(N-Benzyl-3,4-dihydroxybenzylidenecyanoacetamide)	E. coli	Escherichia coli
ANOVA	Varianzanalyse	EDTA	Ethylendiamin Tetraessigsäure
AP	<i>Area postrema</i>	ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
AP-1 bzw. 2	activator protein-1 bzw. 2	eNOS	endotheliale NOS
APR	Akute-Phase-Reaktion	ER	Endoplasmatisches Retikulum
AVP	Vasopressin	ERK	extracelluläre signal-related kinase
BAT	brown adipose tissue	ETOH	Ethanol
BHS	Blut-Hirn-Schranke	EU	Endotoxin Unit
bZIP	basic leucine zipper	F.I.	Fieberindex (° C*h)
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat	FAM®	6-Carboxy-Fluoreszin
CD	cluster of differentiation	FKS	Fetales Kälberserum
cDNA	complementary DNA	FOS	FOS-Protein, Transkriptionsfaktor, Onkogenprodukt
C/EBP	CCAAT-enhancer-binding protein	FOS-IR	FOS-Immunreaktivität
c-fos	Gensequenz auf der DNA für FOS	FRET	Fluorescence resonance energy Transfer
ChP	<i>Plexus choroideus</i>	FSH	Follikelstimulierendes Hormon
COX	Cyclooxygenase	GDP	Guanosindiphosphat
COX-1/2/3	Cyclooxygenase-1/2/3	GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
Crem	Cremophor®EL		Zellmarker für Astrozyten
CRH	Corticotropin-Releasing Hormone	gp130	Glykoprotein 130
CRP2	C/EBP related protein 2	GTP	Guanosintriphosphat
C ^T	cycle threshold	GnRH	Gonadotropin-releasing hormone
CV	correction value	HBSS	Hank's buffered salt solution
CVO	Cirkumventrikuläre Organe	HEPES	(N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
Cy3	rotfluoreszierendes Carbocyanin	HCl	Salzsäure
D.L.	Detektionslimit	HH	Hypothalamus-Hypophysen-Achse
Da	Dalton	HHL	Hypophysenhinterlappen
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol-Dilacetat, Kernfärbung	H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
DEPC	Diethylpyrocarbonat	HPA-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse
DNA	Desoxyribonukleinsäure	HVL	Hypophysenvorderlappen
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat	HZL	Hypophysenzwischenlappen
dd	bidest		

Hz.	Frequenz in Herz	ME	<i>Eminentia mediana</i>
ICAM	intercellulare adhesion molecule	MEK	MAP Kinase/ERK Kinase
icv.	intracerebroventriculär	MGB	Minor groove binder
Ig	Immunglobulin	MG	Molekulargewicht
IFN	Interferon	min.	Minute
IKK	Inhibitorischer Faktor κ B Kinase	MIP	Makrophagen-
I κ B	Inhibitorischer Faktor κ B		Inflammatorisches-Protein
IL-(x)	Interleukin-(x)	MnPO	<i>Nucleus praeropticus medianus</i>
IL-1	Interleukin-1	MPA	<i>Area praeroptica medialis</i>
IL-1 β	Interleukin-1 beta	mPGES	mikrosomale
IL-6	Interleukin-6		Prostaglandin-E-Synthase
IL-1R	Interleukin-1 Rezeptor	MPO	mediale präoptische Region
IL-6-DBP	IL-6-dependant DNA binding protein	mRNA	messenger Ribonukleinsäure
		MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5
IL-6R	Interleukin-6 Rezeptor		Diphenyl-Tetrazoliumbromid
IL-1ra	IL-1-Rezeptor-Antagonist	MyD88	Adaptermolekül des IL-1R
iNOS	induzierbare NO-Synthase	NaCl	Isotone Natriumchlorid Lösung
i.m.	intramuskulär	NADPH-d	Nicotinamid-Adenosin-
i.p.	intraperitoneal		Dinucleotid-Phosphat-
i.r.	immunreaktiv		Diaphorase
I.R.	Immunreaktivität	n.d.	nicht detektierbar bzw. unterhalb
I.U.	international units		der Nachweisgrenze
i.v.	intravenös	NDS	Normal Donkey Serum
IRAK	Interleukin-1 Rezeptor-assozierte Kinase	NF-IL-6	nuclear factor-IL-6
		NF- κ B	nuclear factor κ B
IRF	Interferon regulatory factor	NFQ	non-fluorescent quencher
JAK	Janus-Kinase	NGF	neuronal growth factor
JLU	Justus-Liebig-Universität	NIK	NF- κ B induzierende Kinase
kDa.	Kilo Dalton	nNOS	neuronale NO-Synthase
KGW	Körpermasse	NO	Stickstoffmonoxid
KS	kaltsensitive Neurone	n.s.	nicht signifikant ($p>0,05$)
LAP	liver-enriched activating protein	NSAIDs	nicht steroidale
LBP	LPS binding protein		Entzündungshemmer
LH	Luteinisierendes Hormon	NTS	<i>Nucleus tractus solitarius</i>
LIF	leukemia inhibiting factor	N. vagus	<i>Nervus vagus</i>
LIP	liver-enriched inhibitory protein	oc	<i>Chiasma opticum</i>
LPS	Lipopolysaccharid	OD	Optische Dichte
LPS-B	LPS-Bindungsprotein	ODN	Oligodesoxynukleotid
LRS	leaky ribosom scanning	OSM	oncostatin M
LV	laterale Ventrikel	OVLT	<i>Organum vasculosum</i>
MALP-2	Makrophagen-aktivierendes Lipopeptid-2		<i>laminae terminalis</i>
MAP	Mikrotubuli-assoziertes Protein	PACAP	pituitary adenylate cyclase-
MAPK	mitogen activated protein kinase		activating peptide
MAPKK	MAPK Kinase	PAF	platelet activating factor
MAPKKK	MAPKK Kinase	PAMPs	pathogen-associated molecular patterns

PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalz Lösung	SON	<i>Nucleus supraopticus</i>
PCR	polymerase chain reaction	Ss	single stranded
PEG	Polyethylenglycol	STAT	Signalübersetzer und Aktivator der Transkription oder signal transducer and activator of transcription
PFA	Paraformaldehyd-Lösung	STAT3	STAT-Transkriptionsfaktor 3
PG	Prostaglandin	STH	Somatotropes Hormon
PGE ₂	Prostaglandin-E ₂	sTNFR	löslicher TNFR
PGES	Prostaglandin-E-Synthase	t	Zeit (min.)
PGT	PG-Transporter	TA	totale Aktivität
p.i.	<i>post injectionem</i>	TAD	transcription activation domain
PIN	<i>Organum pineale</i>	Thr	Threonin
Pir	<i>Cortex piriformis</i>	TGF- β	transforming growth factor- β
Pit	Pituitary/Hypophyse	TLR	toll-like Rezeptor
PLA ₂	Phospholipase A ₂	TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
PNS	peripheres Nervensystem	TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
POA	<i>Area praeoptica hypothalami</i> (Präoptische Region)	TNF-bp	Tumor-Nekrose-Faktor-Bindungsprotein
POMC	Proopiomelanocortin	TNFR	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor
PVC	perivaskuläre Zellen	T _{abd}	abdominale Körpertemperatur
PVN	<i>Nucleus paraventricularis hypothalami</i>	TRAF	TNF Rezeptor-assoziiierter Faktor
py	<i>Tractus pyramidalis</i>	TRPs	transient receptor potentials
QRT-PCR	Quantitative Real Time PCR	TSH	Thyreoidea-stimulierendes Hormon
Raf	rapidly growing fibrosarcoma/rat fibrosarcoma	TYK	Tyrosine kinase
ras	reticular activating system	UV	Ultraviolett
RD	regulatory domain	VIC TM	Fluoreszenzfarbstoff, patentgeschützte Formel
RM	Rückenmark	VIP	Vasoactive Intestinal Peptide
RNA	ribonucleic acid	VIII/3V	dritter Hirnventrikel
rpm	rounds per minute	VMH	<i>Nucleus ventromedialis</i>
RQ	relative quantity	VMPO	Nucleus praeopticus ventromedialis; ventromediale präoptische Region
RT	Raumtemperatur	vs.	versus
s.c.	subcutan	vW	von-Willebrand-Faktor
SCN	<i>Nucleus suprachiasmaticus</i>	WS	warmsensitive Neurone
S.E.M.	Standard error of the mean	QK	Qualitätskontrolle
Ser	Serin	ZNS	Zentralnervensystem
sCD14	lösliche CD14 Rezeptoren	α MSH	α -Melanocyte-stimulating hormon
SCO	<i>Organum subcommissurale</i>		
sCVOs	senorischen CVOs		
SFO	Subfornikalorgan (<i>Organum subfornicale</i>)		
sgp130	lösliche gp130		
sIL-6R	lösliche IL-6R		
SOCS	suppressor of cytokine signaling		
Solv.	Solvent/Lösungsmittel		

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

- Aarden LA, De Groot ER, Schaap OL, Lansdorp PM (1987) Production of hybridoma growth factor by human monocytes. *Eur J Immunol* 17:1411-1416.
- Abbas AK, Lichtman AHH, Pillai S (2011) Cellular and Molecular Immunology. Philadelphia, USA: Elsevier Saunders.
- Abbott NJ (2005) Dynamics of CNS barriers: evolution, differentiation, and modulation. *Cell Mol Neurobiol* 25:5-23.
- Abbott NJ, Friedman A (2012) Overview and introduction: The blood-brain barrier in health and disease. *Epilepsia* 53 Suppl 6:1-6.
- Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ (2010) Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis* 37:13-25.
- Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E (2006) Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 7:41-53.
- Abbud RA, Kelleher R, Melmed S (2004) Cell-specific pituitary gene expression profiles after treatment with leukemia inhibitory factor reveal novel modulators for proopiomelanocortin expression. *Endocrinology* 145:867-880.
- Abercrombie ED, Jacobs BL (1987) Single-unit response of noradrenergic neurons in the locus coeruleus of freely moving cats. I. Acutely presented stressful and nonstressful stimuli. *J Neurosci* 7:2837-2843.
- Aderka D, Le JM, Vilcek J (1989) IL-6 inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor production in cultured human monocytes, U937 cells, and in mice. *J Immunol* 143:3517-3523.
- Adriaan Bouwknicht J, Olivier B, Paylor RE (2007) The stress-induced hyperthermia paradigm as a physiological animal model for anxiety: a review of pharmacological and genetic studies in the mouse. *Neurosci Biobehav Rev* 31:41-59.
- Agrawal A, Cha-Molstad H, Samols D, Kushner I (2003) Overexpressed nuclear factor-kappaB can participate in endogenous C-reactive protein induction, and enhances the effects of C/EBPbeta and signal transducer and activator of transcription-3. *Immunology* 108:539-547.
- Aguilera G (2011) HPA axis responsiveness to stress: implications for healthy aging. *Exp Gerontol* 46:90-95.
- Akagi T, Saitoh T, O'Kelly J, Akira S, Gombart AF, Koeffler HP (2008) Impaired response to GM-CSF and G-CSF, and enhanced apoptosis in C/EBPbeta-deficient hematopoietic cells. *Blood* 111:2999-3004.
- Akagi T, Thoennissen NH, George A, Crooks G, Song JH, Okamoto R, Nowak D, Gombart AF, Koeffler HP (2010) In vivo deficiency of both C/EBPbeta and C/EBPepsilon results in highly defective myeloid differentiation and lack of cytokine response. *PLoS One* 5:e15419.
- Akira S (1997) IL-6-regulated transcription factors. *Int J Biochem Cell Biol* 29:1401-1418.

- Akira S, Isshiki H, Nakajima T, Kinoshita S, Nishio Y, Natsuka S, Kishimoto T (1992) Regulation of expression of the interleukin 6 gene: structure and function of the transcription factor NF-IL6. *Ciba Found Symp* 167:47-62; discussion 62-47.
- Akira S, Isshiki H, Sugita T, Tanabe O, Kinoshita S, Nishio Y, Nakajima T, Hirano T, Kishimoto T (1990) A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family. *EMBO J* 9:1897-1906.
- Akira S, Kishimoto T (1992) IL-6 and NF-IL6 in acute-phase response and viral infection. *Immunol Rev* 127:25-50.
- Akira S, Takeda K, Kaisho T (2001) Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2:675-680.
- Allaerts W, Carmeliet P, Denef C (1990) New perspectives in the function of pituitary folliculo-stellate cells. *Mol Cell Endocrinol* 71:73-81.
- Alm P, Sharma HS, Sjoquist PO, Westman J (2000) A new antioxidant compound H-290/51 attenuates nitric oxide synthase and heme oxygenase expression following hyperthermic brain injury. An experimental study using immunohistochemistry in the rat. *Amino Acids* 19:383-394.
- Antunes-Rodrigues J, de Castro M, Elias LL, Valenca MM, McCann SM (2004) Neuroendocrine control of body fluid metabolism. *Physiol Rev* 84:169-208.
- Arzt E (2001) gp130 cytokine signaling in the pituitary gland: a paradigm for cytokine-neuroendocrine pathways. *J Clin Invest* 108:1729-1733.
- Arzt E, Pereda MP, Castro CP, Pagotto U, Renner U, Stalla GK (1999) Pathophysiological role of the cytokine network in the anterior pituitary gland. *Front Neuroendocrinol* 20:71-95.
- Atamna H, Killilea DW, Killilea AN, Ames BN (2002) Heme deficiency may be a factor in the mitochondrial and neuronal decay of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:14807-14812.
- Atzeni F, Straub RH, Cutolo M, Sarzi-Puttini P (2010) Anti-TNF therapy restores the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Ann N Y Acad Sci* 1193:179-181.
- Baeuerle PA, Baltimore D (1996) NF-kappa B: ten years after. *Cell* 87:13-20.
- Baeuerle PA, Henkel T (1994) Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 12:141-179.
- Banks WA, Kastin AJ, Gutierrez EG (1994) Penetration of interleukin-6 across the murine blood-brain barrier. *Neurosci Lett* 179:53-56.
- Banks WA, Ortiz L, Plotkin SR, Kastin AJ (1991) Human interleukin (IL) 1 alpha, murine IL-1 alpha and murine IL-1 beta are transported from blood to brain in the mouse by a shared saturable mechanism. *J Pharmacol Exp Ther* 259:988-996.
- Barbe E, Damoiseaux JG, Dopp EA, Dijkstra CD (1990) Characterization and expression of the antigen present on resident rat macrophages recognized by monoclonal antibody ED2. *Immunobiology* 182:88-99.
- Bauer J, Bauer TM, Kalb T, Taga T, Lengyel G, Hirano T, Kishimoto T, Acs G, Mayer L, Gerok W (1989) Regulation of interleukin 6 receptor expression in human monocytes and monocyte-derived macrophages. Comparison with the expression in human hepatocytes. *J Exp Med* 170:1537-1549.

- Bauer J, Sminia T, Wouterlood FG, Dijkstra CD (1994) Phagocytic activity of macrophages and microglial cells during the course of acute and chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci Res* 38:365-375.
- Baumgartner RA, Deramo VA, Beaven MA (1996) Constitutive and inducible mechanisms for synthesis and release of cytokines in immune cell lines. *J Immunol* 157:4087-4093.
- Bazan JF (1990) Haemopoietic receptors and helical cytokines. *Immunol Today* 11:350-354.
- Bazzoni F, Beutler B (1996) The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med* 334:1717-1725.
- Bechmann I, Galea I, Perry VH (2007) What is the blood-brain barrier (not)? *Trends Immunol* 28:5-11.
- Bechmann I, Kwidzinski E, Kovac AD, Simburger E, Horvath T, Gimsa U, Dirnagl U, Priller J, Nitsch R (2001) Turnover of rat brain perivascular cells. *Exp Neurol* 168:242-249.
- Bemelmans MH, van Tits LJ, Buurman WA (1996) Tumor necrosis factor: function, release and clearance. *Crit Rev Immunol* 16:1-11.
- Berczi I, Bertok L, Chow DA (2000) Natural immunity and neuroimmune host defense. *Ann N Y Acad Sci* 917:248-257.
- Berkenbosch F, van Oers J, del Rey A, Tilders F, Besedovsky H (1987) Corticotropin-releasing factor-producing neurons in the rat activated by interleukin-1. *Science* 238:524-526.
- Bernardini R, Kamilaris TC, Calogero AE, Johnson EO, Gomez MT, Gold PW, Chrousos GP (1990) Interactions between tumor necrosis factor-alpha, hypothalamic corticotropin-releasing hormone, and adrenocorticotropin secretion in the rat. *Endocrinology* 126:2876-2881.
- Bernton EW, Beach JE, Holaday JW, Smallridge RC, Fein HG (1987) Release of multiple hormones by a direct action of interleukin-1 on pituitary cells. *Science* 238:519-521.
- Bertini R, Bianchi M, Ghezzi P (1988) Adrenalectomy sensitizes mice to the lethal effects of interleukin 1 and tumor necrosis factor. *J Exp Med* 167:1708-1712.
- Bethin KE, Vogt SK, Muglia LJ (2000) Interleukin-6 is an essential, corticotropin-releasing hormone-independent stimulator of the adrenal axis during immune system activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:9317-9322.
- Bhattacharya S, Schindler C (2003) Regulation of Stat3 nuclear export. *J Clin Invest* 111:553-559.
- Billack B, Heck DE, Mariano TM, Gardner CR, Sur R, Laskin DL, Laskin JD (2002) Induction of cyclooxygenase-2 by heat shock protein 60 in macrophages and endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 283:C1267-1277.
- Blähser S (1988) The ACTH-immunoreactive system in the brain of the white-crowned sparrow, *Zonotrichia leucophrys gambelii* (Passeriformes, Emberizidae). *Histochemistry* 88.
- Blatteis CM (1986) Fever: is it beneficial? *Yale J Biol Med* 59:107-116.
- Blatteis CM (2004) The cytokine-prostaglandin cascade in fever production: fact or fancy? *Journal of Thermal Biology* 29:359-368.

- Blatteis CM (2006) Endotoxic fever: new concepts of its regulation suggest new approaches to its management. *Pharmacol Ther* 111:194-223.
- Blatteis CM, Sehic, E. (1997) Fever: how may circulating cytokines signal the brain ? *News in Physiological Sciences* 12:1-9.
- Bluthe RM, Castanon N, Pousset F, Bristow A, Ball C, Lestage J, Michaud B, Kelley KW, Dantzer R (1999) Central injection of IL-10 antagonizes the behavioural effects of lipopolysaccharide in rats. *Psychoneuroendocrinology* 24:301-311.
- Bluthe RM, Michaud B, Kelley KW, Dantzer R (1996) Vagotomy attenuates behavioural effects of interleukin-1 injected peripherally but not centrally. *Neuroreport* 7:1485-1488.
- Borghetti P, Saleri R, Mocchegiani E, Corradi A, Martelli P (2009) Infection, immunity and the neuroendocrine response. *Vet Immunol Immunopathol* 130:141-162.
- Boulay D, Depoortere R, Perrault G, Borrelli E, Sanger DJ (1999a) Dopamine D2 receptor knock-out mice are insensitive to the hypolocomotor and hypothermic effects of dopamine D2/D3 receptor agonists. *Neuropharmacology* 38:1389-1396.
- Boulay D, Depoortere R, Rostene W, Perrault G, Sanger DJ (1999b) Dopamine D3 receptor agonists produce similar decreases in body temperature and locomotor activity in D3 knock-out and wild-type mice. *Neuropharmacology* 38:555-565.
- Boutillier AL, Sassone-Corsi P, Loeffler JP (1991) The protooncogene c-fos is induced by corticotropin-releasing factor and stimulates proopiomelanocortin gene transcription in pituitary cells. *Mol Endocrinol* 5:1301-1310.
- Brenner S, Prosch S, Schenke-Layland K, Riese U, Gausmann U, Platzer C (2003) cAMP-induced Interleukin-10 promoter activation depends on CCAAT/enhancer-binding protein expression and monocytic differentiation. *J Biol Chem* 278:5597-5604.
- Briese E, Cabanac M (1991) Stress hyperthermia: physiological arguments that it is a fever. *Physiol Behav* 49:1153-1157.
- Briese E, De Quijada MG (1970) Colonic temperature of rats during handling. *Acta Physiol Lat Am* 20:97-102.
- Bristol JA, Morrison TE, Kenney SC (2009) CCAAT/enhancer binding proteins alpha and beta regulate the tumor necrosis factor receptor 1 gene promoter. *Mol Immunol* 46:2706-2713.
- Brownstein MJ, Russell JT, Gainer H (1980) Synthesis, transport, and release of posterior pituitary hormones. *Science* 207:373-378.
- Brunetti L, Preziosi P, Ragazzoni E, Vacca M (1994) Effects of lipopolysaccharide on hypothalamic-pituitary-adrenal axis in vitro. *Life Sci* 54:PL165-171.
- Buck M, Poli V, van der Geer P, Chojkier M, Hunter T (1999) Phosphorylation of rat serine 105 or mouse threonine 217 in C/EBP beta is required for hepatocyte proliferation induced by TGF alpha. *Mol Cell* 4:1087-1092.
- Buck M, Zhang L, Halasz NA, Hunter T, Chojkier M (2001) Nuclear export of phosphorylated C/EBPbeta mediates the inhibition of albumin expression by TNF-alpha. *Embo J* 20:6712-6723.

- Buller KM (2001) Role of circumventricular organs in pro-inflammatory cytokine-induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 28:581-589.
- Calcagni E, Elenkov I (2006) Stress system activity, innate and T helper cytokines, and susceptibility to immune-related diseases. *Ann N Y Acad Sci* 1069:62-76.
- Caldenhoven E, Buitenhuis M, van Dijk TB, Raaijmakers JA, Lammers JW, Koenderman L, de Groot RP (1999) Lineage-specific activation of STAT3 by interferon-gamma in human neutrophils. *J Leukoc Biol* 65:391-396.
- Cao Z, Xiong J, Takeuchi M, Kurama T, Goeddel DV (1996) TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature* 383:443-446.
- Cappello C, Zwergal A, Kancierski S, Haas SC, Kandemir JD, Huber R, Page S, Brand K (2009) C/EBPbeta enhances NF-kappaB-associated signalling by reducing the level of IkappaB-alpha. *Cell Signal* 21:1918-1924.
- Cardinaux JR, Allaman I, Magistretti PJ (2000) Pro-inflammatory cytokines induce the transcription factors C/EBPbeta and C/EBPdelta in astrocytes. *Glia* 29:91-97.
- Carlson DE (1997) Adrenocorticotropin correlates strongly with endotoxemia after intravenous but not after intraperitoneal inoculations of *E. coli*. *Shock* 7:65-69.
- Carmeliet P, Vankelecom H, Van Damme J, Billiau A, Deneef C (1991) Release of interleukin-6 from anterior pituitary cell aggregates: developmental pattern and modulation by glucocorticoids and forskolin. *Neuroendocrinology* 53:29-34.
- Carmona MC, Hondares E, Rodriguez de la Concepcion ML, Rodriguez-Sureda V, Peinado-Onsurbe J, Poli V, Iglesias R, Villarroya F, Giral M (2005) Defective thermoregulation, impaired lipid metabolism, but preserved adrenergic induction of gene expression in brown fat of mice lacking C/EBPbeta. *Biochem J* 389:47-56.
- Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B (1975) An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72:3666-3670.
- Cartmell T, Luheshi GN, Hopkins SJ, Rothwell NJ, Poole S (2001) Role of endogenous interleukin-1 receptor antagonist in regulating fever induced by localised inflammation in the rat. *J Physiol* 531:171-180.
- Cartmell T, Poole S, Turnbull AV, Rothwell NJ, Luheshi GN (2000) Circulating interleukin-6 mediates the febrile response to localised inflammation in rats. *J Physiol* 526 Pt 3:653-661.
- Cassatella MA, Meda L, Bonora S, Ceska M, Constantin G (1993) Interleukin 10 (IL-10) inhibits the release of proinflammatory cytokines from human polymorphonuclear leukocytes. Evidence for an autocrine role of tumor necrosis factor and IL-1 beta in mediating the production of IL-8 triggered by lipopolysaccharide. *J Exp Med* 178:2207-2211.
- Chai Z, Gatti S, Toniatti C, Poli V, Bartfai T (1996) Interleukin (IL)-6 gene expression in the central nervous system is necessary for fever response to lipopolysaccharide or IL-1 beta: a study on IL-6-deficient mice. *J Exp Med* 183:311-316.
- Chang CJ, Chen TT, Lei HY, Chen DS, Lee SC (1990) Molecular cloning of a transcription factor, AGP/EBP, that belongs to members of the C/EBP family. *Mol Cell Biol* 10:6642-6653.

- Chen TY, Lei MG, Suzuki T, Morrison DC (1992) Lipopolysaccharide receptors and signal transduction pathways in mononuclear phagocytes. *Curr Top Microbiol Immunol* 181:169-188.
- Chrousos GP (1995) The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *N Engl J Med* 332:1351-1362.
- Chrousos GP (2009) Stress and disorders of the stress system. *Nat Rev Endocrinol* 5:374-381.
- Chun KS, Surh YJ (2004) Signal transduction pathways regulating cyclooxygenase-2 expression: potential molecular targets for chemoprevention. *Biochem Pharmacol* 68:1089-1100.
- Cieslik KA, Zhu Y, Shtivelband M, Wu KK (2005) Inhibition of p90 ribosomal S6 kinase-mediated CCAAT/enhancer-binding protein beta activation and cyclooxygenase-2 expression by salicylate. *J Biol Chem* 280:18411-18417.
- Coceani F, Lees J, Mancilla J, Belizario J, Dinarello CA (1993) Interleukin-6 and tumor necrosis factor in cerebrospinal fluid: changes during pyrogen fever. *Brain Res* 612:165-171.
- Colotta F, Re F, Muzio M, Bertini R, Polentarutti N, Sironi M, Giri JG, Dower SK, Sims JE, Mantovani A (1993) Interleukin-1 type II receptor: a decoy target for IL-1 that is regulated by IL-4. *Science* 261:472-475.
- Conti B, Tabarean I, Andrei C, Bartfai T (2004) Cytokines and fever. *Front Biosci* 9:1433-1449.
- Coons AH, Kaplan MH (1950) Localization of antigen in tissue cells; improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. *J Exp Med* 91:1-13.
- Cooper AL, Brouwer S, Turnbull AV, Luheshi GN, Hopkins SJ, Kunkel SL, Rothwell NJ (1994) Tumor necrosis factor-alpha and fever after peripheral inflammation in the rat. *Am J Physiol* 267:R1431-1436.
- Cooper KE, Cranston WI, Honour AJ (1967) Observations on the site & mode of action of pyrogens in the rabbit brain. *J Physiol* 191:325-337.
- Cortes-Canteli M, Aguilar-Morante D, Sanz-Sancristobal M, Megias D, Santos A, Perez-Castillo A (2011) Role of C/EBPbeta transcription factor in adult hippocampal neurogenesis. *PLoS One* 6:e24842.
- Cortes-Canteli M, Luna-Medina R, Sanz-Sancristobal M, Alvarez-Barrientos A, Santos A, Perez-Castillo A (2008) CCAAT/enhancer binding protein beta deficiency provides cerebral protection following excitotoxic injury. *J Cell Sci* 121:1224-1234.
- Cottrell GT, Ferguson AV (2004) Sensory circumventricular organs: central roles in integrated autonomic regulation. *Regul Pept* 117:11-23.
- Croniger C, Trus M, Lysek-Stupp K, Cohen H, Liu Y, Darlington GJ, Poli V, Hanson RW, Reshef L (1997) Role of the isoforms of CCAAT/enhancer-binding protein in the initiation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene transcription at birth. *J Biol Chem* 272:26306-26312.
- Croniger CM, Millward C, Yang J, Kawai Y, Arinze IJ, Liu S, Harada-Shiba M, Chakravarty K, Friedman JE, Poli V, Hanson RW (2001) Mice with a deletion in the gene for CCAAT/enhancer-binding protein beta have an attenuated response to cAMP and impaired carbohydrate metabolism. *J Biol Chem* 276:629-638.

- Cunningham ET, Jr., Miselis RR, Sawchenko PE (1994) The relationship of efferent projections from the area postrema to vagal motor and brain stem catecholamine-containing cell groups: an axonal transport and immunohistochemical study in the rat. *Neuroscience* 58:635-648.
- Cunningham ET, Jr., Sawchenko PE (1988) Anatomical specificity of noradrenergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat hypothalamus. *J Comp Neurol* 274:60-76.
- Damm J (2012) Charakterisierung der Beteiligung des Transkriptionsfaktors NF-IL6 an der Induktion zentralnervös kontrollierter Krankheitssymptome in der Ratte. Giessen: VVB Laufersweiler.
- Damm J, Luheshi GN, Gerstberger R, Roth J, Rummel C (2011) Spatiotemporal nuclear factor interleukin-6 expression in the rat brain during lipopolysaccharide-induced fever is linked to sustained hypothalamic inflammatory target gene induction. *J Comp Neurol* 519:480-505.
- Damoiseaux JG, Dopp EA, Calame W, Chao D, MacPherson GG, Dijkstra CD (1994) Rat macrophage lysosomal membrane antigen recognized by monoclonal antibody ED1. *Immunology* 83:140-147.
- Dantzer R (2001a) Cytokine-induced sickness behavior: mechanisms and implications. *Ann N Y Acad Sci* 933:222-234.
- Dantzer R (2001b) Cytokine-induced sickness behavior: where do we stand? *Brain Behav Immun* 15:7-24.
- Dantzer R, Konsman JP, Bluthé RM, Kelley KW (2000a) Neural and humoral pathways of communication from the immune system to the brain: parallel or convergent? *Auton Neurosci* 85:60-65.
- Dantzer R, Konsman JP, Bluthé RM, Kelley KW (2000b) Neural and humoral pathways of communication from the immune system to the brain: parallel or convergent? *Auton Neurosci* 85:60-65.
- Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, Kelley KW (2008) From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci* 9:46-56.
- Darlington GJ, Ross SE, MacDougald OA (1998) The role of C/EBP genes in adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 273:30057-30060.
- Darnell JE, Jr., Kerr IM, Stark GR (1994) Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264:1415-1421.
- de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE (1991) Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 174:1209-1220.
- Debus E, Weber K, Osborn M (1983) Monoclonal antibodies specific for glial fibrillary acidic (GFA) protein and for each of the neurofilament triplet polypeptides. *Differentiation* 25:193-203.
- Denenberg VH (1969) Open-field behavior in the rat: what does it mean? *Ann N Y Acad Sci* 159:852-859.

- Descombes P, Chojkier M, Lichtsteiner S, Falvey E, Schibler U (1990) LAP, a novel member of the C/EBP gene family, encodes a liver-enriched transcriptional activator protein. *Genes Dev* 4:1541-1551.
- Descombes P, Schibler U (1991) A liver-enriched transcriptional activator protein, LAP, and a transcriptional inhibitory protein, LIP, are translated from the same mRNA. *Cell* 67:569-579.
- DiDonato JA, Hayakawa M, Rothwarf DM, Zandi E, Karin M (1997) A cytokine-responsive I κ B kinase that activates the transcription factor NF- κ B. *Nature* 388:548-554.
- Diehl AM (1998) Roles of CCAAT/enhancer-binding proteins in regulation of liver regenerative growth. *J Biol Chem* 273:30843-30846.
- Dinarello CA (1991) Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood* 77:1627-1652.
- Dinarello CA (1997) Cytokines as endogenous pyrogens. In: *Fever: Basic Mechanisms and Management*, 2nd edn (Mackowiak, C. A., ed), pp 87-116 Philadelphia: Lippincott-Raven.
- Dinarello CA (2004) Infection, fever, and exogenous and endogenous pyrogens: some concepts have changed. *J Endotoxin Res* 10:201-222.
- Dunn AJ (1988) Systemic interleukin-1 administration stimulates hypothalamic norepinephrine metabolism paralleling the increased plasma corticosterone. *Life Sci* 43:429-435.
- Dunn AJ, Berridge CW (1990) Is corticotropin-releasing factor a mediator of stress responses? *Ann N Y Acad Sci* 579:183-191.
- Duprez E, Wagner K, Koch H, Tenen DG (2003) C/EBP β : a major PML-RARA-responsive gene in retinoic acid-induced differentiation of APL cells. *Embo J* 22:5806-5816.
- Durez P, Abramowicz D, Gerard C, Van Mechelen M, Amraoui Z, Dubois C, Leo O, Velu T, Goldman M (1993) In vivo induction of interleukin 10 by anti-CD3 monoclonal antibody or bacterial lipopolysaccharide: differential modulation by cyclosporin A. *J Exp Med* 177:551-555.
- Ejarque-Ortiz A, Medina MG, Tusell JM, Perez-Gonzalez AP, Serratos J, Saura J (2007) Upregulation of CCAAT/enhancer binding protein β in activated astrocytes and microglia. *Glia* 55:178-188.
- Ek M, Arias C, Sawchenko P, Ericsson-Dahlstrand A (2000) Distribution of the EP3 prostaglandin E(2) receptor subtype in the rat brain: relationship to sites of interleukin-1-induced cellular responsiveness. *J Comp Neurol* 428:5-20.
- Elenkov IJ, Wilder RL, Chrousos GP, Vizi ES (2000) The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol Rev* 52:595-638.
- Elliott MJ, Maini RN, Feldmann M, Kalden JR, Antoni C, Smolen JS, Leeb B, Breedveld FC, Macfarlane JD, Bijl H (1994) Randomised double-blind comparison of chimeric monoclonal antibody to tumour necrosis factor α (cA2) versus placebo in rheumatoid arthritis. *Lancet* 344:1105-1110.
- Elmquist JK, Breder CD, Sherin JE, Scammell TE, Hickey WF, Dewitt D, Saper CB (1997a) Intravenous lipopolysaccharide induces cyclooxygenase 2-like immunoreactivity in rat

- brain perivascular microglia and meningeal macrophages. *J Comp Neurol* 381:119-129.
- Elmqvist JK, Scammell TE, Jacobson CD, Saper CB (1996) Distribution of Fos-like immunoreactivity in the rat brain following intravenous lipopolysaccharide administration. *J Comp Neurol* 371:85-103.
- Elmqvist JK, Scammell TE, Saper CB (1997b) Mechanisms of CNS response to systemic immune challenge: the febrile response. *Trends Neurosci* 20:565-570.
- Engblom D, Ek M, Saha S, Ericsson-Dahlstrand A, Jakobsson PJ, Blomqvist A (2002) Prostaglandins as inflammatory messengers across the blood-brain barrier. *J Mol Med* 80:5-15.
- Engler H, Doenlen R, Engler A, Riether C, Prager G, Niemi MB, Pacheco-Lopez G, Krugel U, Schedlowski M (2011) Acute amygdaloid response to systemic inflammation. *Brain Behav Immun* 25:1384-1392.
- Engstrom L, Rosen K, Angel A, Fyrberg A, Mackerlova L, Konsman JP, Engblom D, Blomqvist A (2008) Systemic immune challenge activates an intrinsically regulated local inflammatory circuit in the adrenal gland. *Endocrinology* 149:1436-1450.
- Ericsson A, Arias C, Sawchenko PE (1997) Evidence for an intramedullary prostaglandin-dependent mechanism in the activation of stress-related neuroendocrine circuitry by intravenous interleukin-1. *J Neurosci* 17:7166-7179.
- Ericsson A, Kovacs KJ, Sawchenko PE (1994a) A functional anatomical analysis of central pathways subserving the effects of interleukin-1 on stress-related neuroendocrine neurons. *J Neurosci* 14:897-913.
- Ericsson A, Kovacs KJ, Sawchenko PE (1994b) A functional anatomical analysis of central pathways subserving the effects of interleukin-1 on stress-related neuroendocrine neurons. *J Neurosci* 14:897-913.
- Ericsson A, Liu C, Hart RP, Sawchenko PE (1995) Type 1 interleukin-1 receptor in the rat brain: distribution, regulation, and relationship to sites of IL-1-induced cellular activation. *J Comp Neurol* 361:681-698.
- Espevik T, Nissen-Meyer J (1986) A highly sensitive cell line, WEHI 164 clone 13, for measuring cytotoxic factor/tumor necrosis factor from human monocytes. *J Immunol Methods* 95:99-105.
- Farrar WL, Kilian PL, Ruff MR, Hill JM, Pert CB (1987) Visualization and characterization of interleukin 1 receptors in brain. *J Immunol* 139:459-463.
- Fauquier T, Guerineau NC, McKinney RA, Bauer K, Mollard P (2001) Folliculostellate cell network: a route for long-distance communication in the anterior pituitary. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:8891-8896.
- Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR (1989) Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 170:2081-2095.
- Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A (1991) IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol* 147:3815-3822.
- Fisher CJ, Jr., Slotman GJ, Opal SM, Pribble JP, Bone RC, Emmanuel G, Ng D, Bloedow DC, Catalano MA (1994) Initial evaluation of human recombinant interleukin-1 receptor antagonist in the treatment of sepsis syndrome: a randomized, open-label,

- placebo-controlled multicenter trial. The IL-1RA Sepsis Syndrome Study Group. Crit Care Med 22:12-21.
- Foka P, Kousteni S, Ramji DP (2001) Molecular characterization of the Xenopus CCAAT-enhancer binding protein beta gene promoter. Biochem Biophys Res Commun 285:430-436.
- Fortier ME, Kent S, Ashdown H, Poole S, Boksa P, Luheshi GN (2004) The viral mimic, polyinosinic:polycytidylic acid, induces fever in rats via an interleukin-1-dependent mechanism. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 287:R759-766.
- Frangakis MV, Kimelberg HK (1984) Dissociation of neonatal rat brain by dispase for preparation of primary astrocyte cultures. Neurochem Res 9:1689-1698.
- Frangakis MV, Koopman WJ, Kiyono H, Michalek SM, McGhee JR (1982) An enzymatic method for preparation of dissociated murine Peyer's patch cells enriched for macrophages. J Immunol Methods 48:33-44.
- Freudenberg MA, Galanos C (1990) Bacterial lipopolysaccharides: structure, metabolism and mechanisms of action. Int Rev Immunol 6:207-221.
- Frodl T, O'Keane V (2013) How does the brain deal with cumulative stress? A review with focus on developmental stress, HPA axis function and hippocampal structure in humans. Neurobiol Dis 52:24-37.
- Gabay C (2006) Interleukin-6 and chronic inflammation. Arthritis Res Ther 8 Suppl 2:S3.
- Gaillard RC, Turnill D, Sappino P, Muller AF (1990) Tumor necrosis factor alpha inhibits the hormonal response of the pituitary gland to hypothalamic releasing factors. Endocrinology 127:101-106.
- Ganong WF (2000) Circumventricular organs: definition and role in the regulation of endocrine and autonomic function. Clin Exp Pharmacol Physiol 27:422-427.
- Gatti S, Bartfai T (1993) Induction of tumor necrosis factor-alpha mRNA in the brain after peripheral endotoxin treatment: comparison with interleukin-1 family and interleukin-6. Brain Res 624:291-294.
- Gautron L, Lafon P, Chaigniau M, Tramu G, Laye S (2002) Spatiotemporal analysis of signal transducer and activator of transcription 3 activation in rat brain astrocytes and pituitary following peripheral immune challenge. Neuroscience 112:717-729.
- Gautron L, Lafon P, Tramu G, Laye S (2003) In vivo activation of the interleukin-6 receptor/gp130 signaling pathway in pituitary corticotropes of lipopolysaccharide-treated rats. Neuroendocrinology 77:32-43.
- Gaykema RP, Dijkstra I, Tilders FJ (1995) Subdiaphragmatic vagotomy suppresses endotoxin-induced activation of hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurons and ACTH secretion. Endocrinology 136:4717-4720.
- Gearing AJH, Cartwright, J.E., Wadhwa M. (1994) 25. Biological and immunological assays for cytokines. In: The Cytokine Handbook 2nd edn(Thomson, A. W., ed), pp 507-524 London: Academic Press Ltd.
- Gebke E, Muller AR, Jurzak M, Gerstberger R (1998) Angiotensin II-induced calcium signalling in neurons and astrocytes of rat circumventricular organs. Neuroscience 85:509-520.
- Ghosh S, Karin M (2002) Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. Cell 109 Suppl:S81-96.

- Giltiay NV, Karakashian AA, Alimov AP, Ligthle S, Nikolova-Karakashian MN (2005) Ceramide- and ERK-dependent pathway for the activation of CCAAT/enhancer binding protein by interleukin-1 β in hepatocytes. *J Lipid Res* 46:2497-2505.
- Glavin GB (1985) Stress and brain noradrenaline: a review. *Neurosci Biobehav Rev* 9:233-243.
- Gloddek J, Lohrer P, Stalla J, Arzt E, Stalla GK, Renner U (2001) The intrapituitary stimulatory effect of lipopolysaccharide on ACTH secretion is mediated by paracrine-acting IL-6. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 109:410-415.
- Goldbach JM, Roth J, Zeisberger E (1997) Fever suppression by subdiaphragmatic vagotomy in guinea pigs depends on the route of pyrogen administration. *Am J Physiol* 272:R675-681.
- Goldstein DS, Kopin IJ (2007) Evolution of concepts of stress. *Stress* 10:109-120.
- Gomez-Santos C, Barrachina M, Gimenez-Xavier P, Dalfo E, Ferrer I, Ambrosio S (2005) Induction of C/EBP β and GADD153 expression by dopamine in human neuroblastoma cells. Relationship with alpha-synuclein increase and cell damage. *Brain Res Bull* 65:87-95.
- Gordon CJ (2012a) The mouse: an “average” homeotherm. *Journal of Thermal Biology* 37:2860–3290.
- Gordon CJ (2012b) Thermal physiology of laboratory mice: Defining thermoneutrality. *Journal of Thermal Biology* 37:654-685.
- Goshen I, Yirmiya R (2009) Interleukin-1 (IL-1): a central regulator of stress responses. *Front Neuroendocrinol* 30:30-45.
- Graeber MB, Streit WJ, Kreutzberg GW (1989) Identity of ED2-positive perivascular cells in rat brain. *J Neurosci Res* 22:103-106.
- Grinevich V, Fournier A, Pelletier G (1997) Effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) on corticotropin-releasing hormone (CRH) gene expression in the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain Res* 773:190-196.
- Gross PM, Wall KM, Pang JJ, Shaver SW, Wainman DS (1990) Microvascular specializations promoting rapid interstitial solute dispersion in nucleus tractus solitarius. *Am J Physiol* 259:R1131-1138.
- Gruol DL, Nelson TE (1997) Physiological and pathological roles of interleukin-6 in the central nervous system. *Mol Neurobiol* 15:307-339.
- Gruys E, Toussaint MJ, Niewold TA, Koopmans SJ (2005) Acute phase reaction and acute phase proteins. *J Zhejiang Univ Sci B* 6:1045-1056.
- Guillen J (2012) FELASA guidelines and recommendations. *journal of the american association laboratory animal science* 3.
- Gutierrez EG, Banks WA, Kastin AJ (1993) Murine tumor necrosis factor alpha is transported from blood to brain in the mouse. *J Neuroimmunol* 47:169-176.
- Gyllenstein UB, Erlich HA (1988) Generation of single-stranded DNA by the polymerase chain reaction and its application to direct sequencing of the HLA-DQA locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:7652-7656.
- Hamrah P, Dana MR (2007) Corneal antigen-presenting cells. *Chem Immunol Allergy* 92:58-70.

- Hamrah P, Huq SO, Liu Y, Zhang Q, Dana MR (2003) Corneal immunity is mediated by heterogeneous population of antigen-presenting cells. *J Leukoc Biol* 74:172-178.
- Hanada T, Yoshimura A (2002) Regulation of cytokine signaling and inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev* 13:413-421.
- Hannum CH, Wilcox CJ, Arend WP, Joslin FG, Dripps DJ, Heimdal PL, Armes LG, Sommer A, Eisenberg SP, Thompson RC (1990) Interleukin-1 receptor antagonist activity of a human interleukin-1 inhibitor. *Nature* 343:336-340.
- Harkin A, O'Donnell JM, Kelly JP (2002) A study of VitalView for behavioural and physiological monitoring in laboratory rats. *Physiol Behav* 77:65-77.
- Harré EM, Roth J, Gerstberger R, Hübschle T (2003) Interleukin-6 mediates lipopolysaccharide-induced nuclear STAT3 translocation in astrocytes of rat sensory circumventricular organs. *Brain Res* 980:151-155.
- Harré EM, Roth J, Pehl U, Kueth M, Gerstberger R, Hübschle T (2002) Selected contribution: role of IL-6 in LPS-induced nuclear STAT3 translocation in sensory circumventricular organs during fever in rats. *J Appl Physiol* 92:2657-2666.
- Hashida-Okumura A, Okumura N, Iwamatsu A, Buijs RM, Romijn HJ, Nagai K (1999) Interaction of neuronal nitric-oxide synthase with alpha1-syntrophin in rat brain. *J Biol Chem* 274:11736-11741.
- Hayley S, Mangano E, Strickland M, Anisman H (2008) Lipopolysaccharide and a social stressor influence behaviour, corticosterone and cytokine levels: divergent actions in cyclooxygenase-2 deficient mice and wild type controls. *J Neuroimmunol* 197:29-36.
- Hedrick RFWaPW (1997) Genetics: Wm.C. Brown Publishers.
- Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F (2003) Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 374:1-20.
- Heinrich PC, Behrmann I, Müller-Newen G, Schaper F, Graeve L (1998a) Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* 334 (Pt 2):297-314.
- Heinrich PC, Behrmann I, Müller-Newen G, Schaper F, Graeve L (1998b) Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* 334 (Pt 2):297-314.
- Heldin CH (1995) Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell* 80:213-223.
- Herman JP, Cullinan WE (1997) Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosci* 20:78-84.
- Herman JP, Figueiredo H, Mueller NK, Ulrich-Lai Y, Ostrander MM, Choi DC, Cullinan WE (2003) Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front Neuroendocrinol* 24:151-180.
- Herman JP, McKlveen JM, Solomon MB, Carvalho-Netto E, Myers B (2012) Neural regulation of the stress response: glucocorticoid feedback mechanisms. *Braz J Med Biol Res* 45:292-298.

- Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R (1992) Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)* 10:413-417.
- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R (1993) Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* 11:1026-1030.
- Holst O, Ulmer AJ, Brade H, Flad HD, Rietschel ET (1996) Biochemistry and cell biology of bacterial endotoxins. *FEMS Immunol Med Microbiol* 16:83-104.
- Honkaniemi J, Kainu T, Ceccatelli S, Rechardt L, Hokfelt T, Pelto-Huikko M (1992) Fos and jun in rat central amygdaloid nucleus and paraventricular nucleus after stress. *Neuroreport* 3:849-852.
- Hori T, Kiyohara T, Shibata M, Oomura Y, Nishino H, Aou S, Fujita I (1986) Responsiveness of monkey preoptic thermosensitive neurons to non-thermal emotional stimuli. *Brain Res Bull* 17:75-82.
- Hori T, Shibata M, Nakashima T, Yamasaki M, Asami A, Asami T, Koga H (1988) Effects of interleukin-1 and arachidonate on the preoptic and anterior hypothalamic neurons. *Brain Res Bull* 20:75-82.
- Howard M, O'Garra A (1992) Biological properties of interleukin 10. *Immunol Today* 13:198-200.
- Huang CJ, Stewart JK, Franco RL, Evans RK, Lee ZP, Cruz TD, Webb HE, Acevedo EO (2011) LPS-stimulated tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 mRNA and cytokine responses following acute psychological stress. *Psychoneuroendocrinology* 36:1553-1561.
- Hubschle T, Mutze J, Muhlradt PF, Korte S, Gerstberger R, Roth J (2006) Pyrexia, anorexia, adipisia, and depressed motor activity in rats during systemic inflammation induced by the Toll-like receptors-2 and -6 agonists MALP-2 and FSL-1. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290:R180-187.
- Hughes TK, Cadet P, Rady PL, Tying SK, Chin R, Smith EM (1994) Evidence for the production and action of interleukin-10 in pituitary cells. *Cell Mol Neurobiol* 14:59-69.
- Hunter CA, Ellis-Neyes LA, Slifer T, Kanaly S, Grunig G, Fort M, Rennick D, Araujo FG (1997) IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol* 158:3311-3316.
- Hurst HC (1995) Transcription factors 1: bZIP proteins. *Protein Profile* 2:101-168.
- Ibelgaufts H (1995) Dictionary of cytokines. Weinheim: VCH Verlag.
- Inoue K, Mogi C, Ogawa S, Tomida M, Miyai S (2002) Are folliculo-stellate cells in the anterior pituitary gland supportive cells or organ-specific stem cells? *Arch Physiol Biochem* 110:50-53.
- Isshiki H, Akira S, Tanabe O, Nakajima T, Shimamoto T, Hirano T, Kishimoto T (1990) Constitutive and interleukin-1 (IL-1)-inducible factors interact with the IL-1-responsive element in the IL-6 gene. *Mol Cell Biol* 10:2757-2764.
- Iwasaki Y, Taguchi T, Nishiyama M, Asai M, Yoshida M, Kambayashi M, Takao T, Hashimoto K (2008) Lipopolysaccharide stimulates proopiomelanocortin gene expression in AtT20 corticotroph cells. *Endocr J* 55:285-290.

- Jackson DL (1967) A hypothalamic region responsive to localized injection of pyrogens. *J Neurophysiol* 30:586-602.
- Jansky L, Vybiral S, Pospisilova D, Roth J, Dornand J, Zeisberger E, Kaminkova J (1995) Production of systemic and hypothalamic cytokines during the early phase of endotoxin fever. *Neuroendocrinology* 62:55-61.
- Jara LJ, Navarro C, Medina G, Vera-Lastra O, Blanco F (2006) Immune-neuroendocrine interactions and autoimmune diseases. *Clin Dev Immunol* 13:109-123.
- John CD, Buckingham JC (2003) Cytokines: regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Curr Opin Pharmacol* 3:78-84.
- Johnson HM, Torres BA, Smith EM, Dion LD, Blalock JE (1984) Regulation of lymphokine (gamma-interferon) production by corticotropin. *J Immunol* 132:246-250.
- Jurzak M, Muller AR, Schmid HA, Gerstberger R (1994) Primary culture of circumventricular organs from the rat brain lamina terminalis. *Brain Res* 662:198-208.
- Kabbaj M, Akil H (2001) Individual differences in novelty-seeking behavior in rats: a c-fos study. *Neuroscience* 106:535-545.
- Kalinichenko VV, Mokyr MB, Graf LH, Jr., Cohen RL, Chambers DA (1999) Norepinephrine-mediated inhibition of antitumor cytotoxic T lymphocyte generation involves a beta-adrenergic receptor mechanism and decreased TNF-alpha gene expression. *J Immunol* 163:2492-2499.
- Kapcala LP, Chautard T, Eskay RL (1995) The protective role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis against lethality produced by immune, infectious, and inflammatory stress. *Ann N Y Acad Sci* 771:419-437.
- Karalis KP, Venihaki M, Zhao J, van Vlerken LE, Chandras C (2004) NF-kappaB participates in the corticotropin-releasing, hormone-induced regulation of the pituitary proopiomelanocortin gene. *J Biol Chem* 279:10837-10840.
- Katsuura G, Arimura A, Koves K, Gottschall PE (1990) Involvement of organum vasculosum of lamina terminalis and preoptic area in interleukin 1 beta-induced ACTH release. *Am J Physiol* 258:E163-171.
- Katz RJ, Roth KA, Carroll BJ (1981) Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: implications for a model of depression. *Neurosci Biobehav Rev* 5:247-251.
- Katz S, Kowenz-Leutz E, Muller C, Meese K, Ness SA, Leutz A (1993) The NF-M transcription factor is related to C/EBP beta and plays a role in signal transduction, differentiation and leukemogenesis of avian myelomonocytic cells. *Embo J* 12:1321-1332.
- Keane KM, Giegel DA, Lipinski WJ, Callahan MJ, Shivers BD (1995) Cloning, tissue expression and regulation of rat interleukin 1 beta converting enzyme. *Cytokine* 7:105-110.
- Kehrer P, Turnill D, Dayer JM, Muller AF, Gaillard RC (1988) Human recombinant interleukin-1 beta and -alpha, but not recombinant tumor necrosis factor alpha stimulate ACTH release from rat anterior pituitary cells in vitro in a prostaglandin E2 and cAMP independent manner. *Neuroendocrinology* 48:160-166.
- Kemp DJ, Smith DB, Foote SJ, Samaras N, Peterson MG (1989) Colorimetric detection of specific DNA segments amplified by polymerase chain reactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:2423-2427.

- Kent S, Bluthé RM, Kelley KW, Dantzer R (1992) Sickness behavior as a new target for drug development. *Trends Pharmacol Sci* 13:24-28.
- Kielian T (2006) Toll-like receptors in central nervous system glial inflammation and homeostasis. *J Neurosci Res* 83:711-730.
- Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA (2007) *Kuby Immunology*: W.H. Freeman & Co Ltd.
- Kishimoto T, Akira S, Narazaki M, Taga T (1995) Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood* 86:1243-1254.
- Kishimoto T, Taga T, Akira S (1994) Cytokine signal transduction. *Cell* 76:253-262.
- Kisseleva T, Bhattacharya S, Braunstein J, Schindler CW (2002) Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene* 285:1-24.
- Kluger MJ (1991) Fever: role of pyrogens and cryogens. *Physiol Rev* 71:93-127.
- Kluger MJ, O'Reilly B, Shope TR, Vander AJ (1987) Further evidence that stress hyperthermia is a fever. *Physiol Behav* 39:763-766.
- Koenig JJ, Snow K, Clark BD, Toni R, Cannon JG, Shaw AR, Dinarello CA, Reichlin S, Lee SL, Lechan RM (1990) Intrinsic pituitary interleukin-1 beta is induced by bacterial lipopolysaccharide. *Endocrinology* 126:3053-3058.
- Kolyada AY, Madias NE (2001) Transcriptional regulation of the human iNOS gene by IL-1beta in endothelial cells. *Mol Med* 7:329-343.
- Kononen J, Honkaniemi J, Alho H, Koistinaho J, Iadarola M, Peltö-Huikko M (1992) Fos-like immunoreactivity in the rat hypothalamic-pituitary axis after immobilization stress. *Endocrinology* 130:3041-3047.
- Konsman JP, Kelley K, Dantzer R (1999) Temporal and spatial relationships between lipopolysaccharide-induced expression of Fos, interleukin-1beta and inducible nitric oxide synthase in rat brain. *Neuroscience* 89:535-548.
- Konsman JP, Vignes S, Mackerlova L, Bristow A, Blomqvist A (2004) Rat brain vascular distribution of interleukin-1 type-1 receptor immunoreactivity: relationship to patterns of inducible cyclooxygenase expression by peripheral inflammatory stimuli. *J Comp Neurol* 472:113-129.
- Kosaka T, Miyata A, Ihara H, Hara S, Sugimoto T, Takeda O, Takahashi E, Tanabe T (1994) Characterization of the human gene (PTGS2) encoding prostaglandin-endoperoxide synthase 2. *Eur J Biochem* 221:889-897.
- Kouzarides T, Ziff E (1989) Leucine zippers of fos, jun and GCN4 dictate dimerization specificity and thereby control DNA binding. *Nature* 340:568-571.
- Kovacs KA, Steinmann M, Magistretti PJ, Halfon O, Cardinaux JR (2006) C/EBPbeta couples dopamine signalling to substance P precursor gene expression in striatal neurones. *J Neurochem* 98:1390-1399.
- Kozak W, Kluger MJ, Soszynski D, Conn CA, Rudolph K, Leon LR, Zheng H (1998) IL-6 and IL-1 beta in fever. Studies using cytokine-deficient (knockout) mice. *Ann N Y Acad Sci* 856:33-47.
- Kozak W, Zheng H, Conn CA, Soszynski D, van der Ploeg LH, Kluger MJ (1995) Thermal and behavioral effects of lipopolysaccharide and influenza in interleukin-1 beta-deficient mice. *Am J Physiol* 269:R969-977.

- Krebs DL, Hilton DJ (2001) SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling. *Stem Cells* 19:378-387.
- Krzyszton CP, Sparkman NL, Grant RW, Buchanan JB, Broussard SR, Woods J, Johnson RW (2008) Exacerbated fatigue and motor deficits in interleukin-10-deficient mice after peripheral immune stimulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295:R1109-1114.
- Kuo CF, Xanthopoulos KG, Darnell JE, Jr. (1990) Fetal and adult localization of C/EBP: evidence for combinatorial action of transcription factors in cell-specific gene expression. *Development* 109:473-481.
- Kutyavin IV, Afonina IA, Mills A, Gorn VV, Lukhtanov EA, Belousov ES, Singer MJ, Walburger DK, Lokhov SG, Gall AA, Dempcy R, Reed MW, Meyer RB, Hedgpeth J (2000) 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Res* 28:655-661.
- Laflamme N, Echchannaoui H, Landmann R, Rivest S (2003) Cooperation between toll-like receptor 2 and 4 in the brain of mice challenged with cell wall components derived from gram-negative and gram-positive bacteria. *Eur J Immunol* 33:1127-1138.
- Laflamme N, Rivest S (2001) Toll-like receptor 4: the missing link of the cerebral innate immune response triggered by circulating gram-negative bacterial cell wall components. *Faseb J* 15:155-163.
- Landgraf R, Malkinson T, Horn T, Veale WL, Lederis K, Pittman QJ (1990) Release of vasopressin and oxytocin by paraventricular stimulation in rats. *Am J Physiol* 258:R155-159.
- Landschulz WH, Johnson PF, Adashi EY, Graves BJ, McKnight SL (1988) Isolation of a recombinant copy of the gene encoding C/EBP. *Genes Dev* 2:786-800.
- Lansdorp PM, Aarden LA, Calafat J, Zeiljemaker WP (1986) A growth-factor dependent B-cell hybridoma. *Curr Top Microbiol Immunol* 132:105-113.
- Lau WW, Ng JK, Lee MM, Chan AS, Wong YH (2012) Interleukin-6 autocrine signaling mediates melatonin MT(1/2) receptor-induced STAT3 Tyr(705) phosphorylation. *J Pineal Res* 52:477-489.
- Layé S, Gheusi G, Cremona S, Combe C, Kelley K, Dantzer R, Parnet P (2000) Endogenous brain IL-1 mediates LPS-induced anorexia and hypothalamic cytokine expression [In Process Citation]. 279:R93-R98.
- Laye S, Parnet P, Goujon E, Dantzer R (1994) Peripheral administration of lipopolysaccharide induces the expression of cytokine transcripts in the brain and pituitary of mice. *Brain research Molecular brain research* 27:157-162.
- Lebel E, Vallières L, Rivest S (2000) Selective involvement of interleukin-6 in the transcriptional activation of the suppressor of cytokine signaling-3 in the brain during systemic immune challenges. *Endocrinology* 141:3749-3763.
- LeClair KP, Blonar MA, Sharp PA (1992) The p50 subunit of NF-kappa B associates with the NF-IL6 transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:8145-8149.
- LeMay LG, Vander AJ, Kluger MJ (1990) The effects of psychological stress on plasma interleukin-6 activity in rats. *Physiol Behav* 47:957-961.

- Lentsch AB, Shanley TP, Sarma V, Ward PA (1997) In vivo suppression of NF-kappa B and preservation of I kappa B alpha by interleukin-10 and interleukin-13. *J Clin Invest* 100:2443-2448.
- Leon LR, Kozak W, Peschon J, Kluger MJ (1997) Exacerbated febrile responses to LPS, but not turpentine, in TNF double receptor-knockout mice. *Am J Physiol* 272:R563-569.
- Levy DE, Kessler DS, Pine R, Reich N, Darnell JE, Jr. (1988) Interferon-induced nuclear factors that bind a shared promoter element correlate with positive and negative transcriptional control. *Genes Dev* 2:383-393.
- Lewis M, Tartaglia LA, Lee A, Bennett GL, Rice GC, Wong GH, Chen EY, Goeddel DV (1991) Cloning and expression of cDNAs for two distinct murine tumor necrosis factor receptors demonstrate one receptor is species specific. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:2830-2834.
- Li H, Gade P, Xiao W, Kalvakolanu DV (2007) The interferon signaling network and transcription factor C/EBP-beta. *Cell Mol Immunol* 4:407-418.
- Liao J, Keiser JA, Scales WE, Kunkel SL, Kluger MJ (1995) Role of epinephrine in TNF and IL-6 production from isolated perfused rat liver. *Am J Physiol* 268:R896-901.
- Liao W, Yu C, Wen J, Jia W, Li G, Ke Y, Zhao S, Campell W (2009) Adiponectin induces interleukin-6 production and activates STAT3 in adult mouse cardiac fibroblasts. *Biol Cell* 101:263-272.
- Lieu ZZ, Lock JG, Hammond LA, La Gruta NL, Stow JL, Gleeson PA (2008) A trans-Golgi network golgin is required for the regulated secretion of TNF in activated macrophages in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:3351-3356.
- Lin JH, Lin MT (1996) Inhibition of nitric oxide synthase or cyclo-oxygenase pathways in organum vasculosum laminae terminalis attenuates interleukin-1 beta fever in rabbits. *Neurosci Lett* 208:155-158.
- Liu H, Sidiropoulos P, Song G, Pagliari LJ, Birrer MJ, Stein B, Anrather J, Pope RM (2000) TNF-alpha gene expression in macrophages: regulation by NF-kappa B is independent of c-Jun or C/EBP beta. *J Immunol* 164:4277-4285.
- Liu S, Croniger C, Arizmendi C, Harada-Shiba M, Ren J, Poli V, Hanson RW, Friedman JE (1999) Hypoglycemia and impaired hepatic glucose production in mice with a deletion of the C/EBPbeta gene. *J Clin Invest* 103:207-213.
- Liu YW, Chen CC, Tseng HP, Chang WC (2006) Lipopolysaccharide-induced transcriptional activation of interleukin-10 is mediated by MAPK- and NF-kappaB-induced CCAAT/enhancer-binding protein delta in mouse macrophages. *Cell Signal* 18:1492-1500.
- Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K (1995) Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl* 4:357-362.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402-408.
- Lohrer P, Gloddek J, Nagashima AC, Koral Z, Hopfner U, Pereda MP, Arzt E, Stalla GK, Renner U (2000) Lipopolysaccharide directly stimulates the intrapituitary interleukin-6 production by folliculostellate cells via specific receptors and the p38alpha mitogen-

- activated protein kinase/nuclear factor-kappaB pathway. *Endocrinology* 141:4457-4465.
- Long NC, Kunkel SL, Vander AJ, Kluger MJ (1990a) Antiserum against tumor necrosis factor enhances lipopolysaccharide fever in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 258:R332-337.
- Long NC, Vander AJ, Kluger MJ (1990b) Stress-induced rise of body temperature in rats is the same in warm and cool environments. *Physiol Behav* 47:773-775.
- Long NC, Vander AJ, Kunkel SL, Kluger MJ (1990c) Antiserum against tumor necrosis factor increases stress hyperthermia in rats. *Am J Physiol* 258:R591-595.
- Lopresti AL, Hood SD, Drummond PD (2013) A review of lifestyle factors that contribute to important pathways associated with major depression: Diet, sleep and exercise. *J Affect Disord*.
- Lu YC, Kim I, Lye E, Shen F, Suzuki N, Suzuki S, Gerondakis S, Akira S, Gaffen SL, Yeh WC, Ohashi PS (2009) Differential role for c-Rel and C/EBPbeta/delta in TLR-mediated induction of proinflammatory cytokines. *J Immunol* 182:7212-7221.
- Luheshi G, Miller AJ, Brouwer S, Dascombe MJ, Rothwell NJ, Hopkins SJ (1996) Interleukin-1 receptor antagonist inhibits endotoxin fever and systemic interleukin-6 induction in the rat. *Am J Physiol* 270:E91-95.
- Lutticken C, Wegenka UM, Yuan J, Buschmann J, Schindler C, Ziemiecki A, Harpur AG, Wilks AF, Yasukawa K, Taga T, et al. (1994) Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak1 with the interleukin-6 signal transducer gp130. *Science* 263:89-92.
- Luttmann W, Bratke, K., Küpper, M. & Myrtek, D. (2006) *Der Experimentator Immunologie*. München.
- Maggio M, Guralnik JM, Longo DL, Ferrucci L (2006) Interleukin-6 in aging and chronic disease: a magnificent pathway. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 61:575-584.
- Manderson AP, Kay JG, Hammond LA, Brown DL, Stow JL (2007) Subcompartments of the macrophage recycling endosome direct the differential secretion of IL-6 and TNFalpha. *J Cell Biol* 178:57-69.
- Martin M, Bol GF, Eriksson A, Resch K, Brigelius-Flohe R (1994) Interleukin-1-induced activation of a protein kinase co-precipitating with the type I interleukin-1 receptor in T cells. *Eur J Immunol* 24:1566-1571.
- Mastorakos G, Chrousos GP, Weber JS (1993) Recombinant interleukin-6 activates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 77:1690-1694.
- Matot I, Sprung CL (1998) Corticosteroids in septic shock: resurrection of the last rites? *Crit Care Med* 26:627-630.
- Matsumoto H, Kumon Y, Watanabe H, Ohnishi T, Shudou M, Ii C, Takahashi H, Imai Y, Tanaka J (2007) Antibodies to CD11b, CD68, and lectin label neutrophils rather than microglia in traumatic and ischemic brain lesions. *J Neurosci Res* 85:994-1009.
- Matsumura K, Cao C, Ozaki M, Morii H, Nakadate K, Watanabe Y (1998) Brain endothelial cells express cyclooxygenase-2 during lipopolysaccharide-induced fever: light and electron microscopic immunocytochemical studies. *J Neurosci* 18:6279-6289.

- Matsumura K, Kobayashi S (2004) Signaling the brain in inflammation: the role of endothelial cells. *Front Biosci* 9:2819-2826.
- Matsusaka T, Fujikawa K, Nishio Y, Mukaida N, Matsushima K, Kishimoto T, Akira S (1993) Transcription factors NF-IL6 and NF-kappa B synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines, interleukin 6 and interleukin 8. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:10193-10197.
- May LT, Ghrayeb J, Santhanam U, Tatter SB, Sthoeger Z, Helfgott DC, Chiorazzi N, Grieninger G, Sehgal PB (1988) Synthesis and secretion of multiple forms of beta 2-interferon/B-cell differentiation factor 2/hepatocyte-stimulating factor by human fibroblasts and monocytes. *J Biol Chem* 263:7760-7766.
- Mazia D, Schatten G, Sale W (1975) Adhesion of cells to surfaces coated with polylysine. Applications to electron microscopy. *J Cell Biol* 66:198-200.
- McCurdy JD, Lin TJ, Marshall JS (2001) Toll-like receptor 4-mediated activation of murine mast cells. *J Leukoc Biol* 70:977-984.
- McKinley MJ, Gerstberger R, Mathai ML, Oldfield BJ, Schmid H (1999) The lamina terminalis and its role in fluid and electrolyte homeostasis. *J Clin Neurosci* 6:289-301.
- McKinley MJ, McAllen RM, Davern P, Giles ME, Penschow J, Sunn N, Uschakov A, Oldfield BJ (2003) The sensory circumventricular organs of the mammalian brain. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 172:III-XII, 1-122, back cover.
- McKnight SL, Lane MD, Gluecksohn-Waelsch S (1989) Is CCAAT/enhancer-binding protein a central regulator of energy metabolism? *Genes Dev* 3:2021-2024.
- Mehet DK, Philip J, Solito E, Buckingham JC, John CD (2012) Evidence from in vitro and in vivo studies showing that nuclear factor-kappaB within the pituitary folliculostellate cells and corticotrophs regulates adrenocorticotrophic hormone secretion in experimental endotoxaemia. *J Neuroendocrinol* 24:862-873.
- Mekaouche M, Givalois L, Barbanel G, Siaud P, Maurel D, Malaval F, Bristow AF, Boissin J, Assenmacher I, Ixart G (1994) Chronic restraint enhances interleukin-1-beta release in the basal state and after an endotoxin challenge, independently of adrenocorticotropin and corticosterone release. *Neuroimmunomodulation* 1:292-299.
- Mercurio F, Zhu H, Murray BW, Shevchenko A, Bennett BL, Li J, Young DB, Barbosa M, Mann M, Manning A, Rao A (1997) IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated IkappaB kinases essential for NF-kappaB activation. *Science* 278:860-866.
- Metzger L, Lee JK, Finer-Moore JS, Raetz CR, Stroud RM (2012) LpxI structures reveal how a lipid A precursor is synthesized. *Nat Struct Mol Biol* 19:1132-1138.
- Meyer T, Gavenis K, Vinkemeier U (2002) Cell type-specific and tyrosine phosphorylation-independent nuclear presence of STAT1 and STAT3. *Exp Cell Res* 272:45-55.
- Milenkovic L, Rettori V, Snyder GD, Beutler B, McCann SM (1989) Cachectin alters anterior pituitary hormone release by a direct action in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:2418-2422.
- Millward CA, Heaney JD, Sinasac DS, Chu EC, Bederman IR, Gilge DA, Previs SF, Croniger CM (2007) Mice with a deletion in the gene for CCAAT/enhancer-binding protein beta are protected against diet-induced obesity. *Diabetes* 56:161-167.
- Miric D, Venet R, Aproh E, Nguyen-Duc H (1997) Psychogenic fever or psychogenic hyperthermia? *J Am Geriatr Soc* 45:1287-1288.

- Moore RY, Eichler VB (1972) Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res* 42:201-206.
- Morimoto A, Watanabe T, Morimoto K, Nakamori T, Murakami N (1991) Possible involvement of prostaglandins in psychological stress-induced responses in rats. *J Physiol* 443:421-429.
- Morrow LE, McClellan JL, Conn CA, Kluger MJ (1993) Glucocorticoids alter fever and IL-6 responses to psychological stress and to lipopolysaccharide. *Am J Physiol* 264:R1010-1016.
- Morrow LE, McClellan JL, Klir JJ, Kluger MJ (1996) The CNS site of glucocorticoid negative feedback during LPS- and psychological stress-induced fevers. *Am J Physiol* 271:R732-737.
- Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW (2006) Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* 443:289-295.
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55-63.
- Motyl KJ, Raetz M, Tekalur SA, Schwartz RC, McCabe LR (2011) CCAAT/enhancer binding protein beta-deficiency enhances type 1 diabetic bone phenotype by increasing marrow adiposity and bone resorption. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 300:R1250-1260.
- Mühlhardt C (2009) *Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics* Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Mukaida N, Morita M, Ishikawa Y, Rice N, Okamoto S, Kasahara T, Matsushima K (1994) Novel mechanism of glucocorticoid-mediated gene repression. Nuclear factor-kappa B is target for glucocorticoid-mediated interleukin 8 gene repression. *J Biol Chem* 269:13289-13295.
- Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155:335-350.
- Myers B, McKlveen JM, Herman JP (2012) Neural Regulation of the Stress Response: The Many Faces of Feedback. *Cell Mol Neurobiol*.
- Nadeau S, Rivest S (1999) Effects of circulating tumor necrosis factor on the neuronal activity and expression of the genes encoding the tumor necrosis factor receptors (p55 and p75) in the rat brain: a view from the blood-brain barrier. *Neuroscience* 93:1449-1464.
- Nadjar A, Combe C, Layé S, Tridon V, Dantzer R, Amedee T, Parnet P (2003) Nuclear factor κ B nuclear translocation as a crucial marker of brain response to interleukin-1. A study in rat and interleukin-1 type I deficient mouse. *J Neurochem* 87:1024-1036.
- Nadjar A, Tridon V, May MJ, Ghosh S, Dantzer R, Amedee T, Parnet P (2005) NFkappaB activates in vivo the synthesis of inducible Cox-2 in the brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 25:1047-1059.
- Nagashima K, Nakai S, Tanaka M, Kanosue K (2000) Neuronal circuitries involved in thermoregulation. *Auton Neurosci* 85:18-25.
- Naitoh Y, Fukata J, Tominaga T, Nakai Y, Tamai S, Mori K, Imura H (1988) Interleukin-6 stimulates the secretion of adrenocorticotrophic hormone in conscious, freely-moving rats. *Biochem Biophys Res Commun* 155:1459-1463.

- Nakajima T, Kinoshita S, Sasagawa T, Sasaki K, Naruto M, Kishimoto T, Akira S (1993) Phosphorylation at threonine-235 by a ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade is essential for transcription factor NF-IL6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:2207-2211.
- Nakamura K, Kaneko T, Yamashita Y, Hasegawa H, Katoh H, Ichikawa A, Negishi M (1999) Immunocytochemical localization of prostaglandin EP3 receptor in the rat hypothalamus. *Neurosci Lett* 260:117-120.
- Nakamura K, Matsumura K, Kaneko T, Kobayashi S, Katoh H, Negishi M (2002) The rostral raphe pallidus nucleus mediates pyrogenic transmission from the preoptic area. *J Neurosci* 22:4600-4610.
- Nakamura K, Morrison SF (2007) Central efferent pathways mediating skin cooling-evoked sympathetic thermogenesis in brown adipose tissue. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292:R127-136.
- Nakamura K, Morrison SF (2011) Central efferent pathways for cold-defensive and febrile shivering. *J Physiol* 589:3641-3658.
- Nakane H, Shimizu N, Hori T (1994) Stress-induced norepinephrine release in the rat prefrontal cortex measured by microdialysis. *Am J Physiol* 267:R1559-1566.
- Nash AD, Brandon MR, Bello PA (1992) Effects of tumour necrosis factor-alpha on growth hormone and interleukin 6 mRNA in ovine pituitary cells. *Mol Cell Endocrinol* 84:R31-37.
- Nava F, Calapai G, Facciola G, Cuzzocrea S, Marciano MC, De Sarro A, Caputi AP (1997) Effects of interleukin-10 on water intake, locomotory activity, and rectal temperature in rat treated with endotoxin. *Int J Immunopharmacol* 19:31-38.
- Nickel R, Schummer A, Seiferle E (1992) *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere*.
- Nicklas W, Deeny A, Diercks P, Gobbi A, B. Illgen-Wilcke, Seidelin M (2010) FELASA guidelines for the accreditation of health monitoring programs and testing laboratories involved in health monitoring. *Lab animal (NY)* 2:43-48.
- Niehof M, Streetz K, Rakemann T, Bischoff SC, Manns MP, Horn F, Trautwein C (2001) Interleukin-6-induced tethering of STAT3 to the LAP/C/EBPbeta promoter suggests a new mechanism of transcriptional regulation by STAT3. *J Biol Chem* 276:9016-9027.
- Nishizawa M, Nagata S (1990) Regulatory elements responsible for inducible expression of the granulocyte colony-stimulating factor gene in macrophages. *Mol Cell Biol* 10:2002-2011.
- Ohmichi M, Hirota K, Koike K, Kurachi H, Ohtsuka S, Matsuzaki N, Yamaguchi M, Miyake A, Tanizawa O (1992) Binding sites for interleukin-6 in the anterior pituitary gland. *Neuroendocrinology* 55:199-203.
- Ohtsuki S (2004) [Physiological function of blood-brain barrier transporters as the CNS supporting and protecting system]. *Yakugaku Zasshi* 124:791-802.
- Oka T, Oka K, Hori T (2001) Mechanisms and mediators of psychological stress-induced rise in core temperature. *Psychosom Med* 63:476-486.
- Oka T, Oka K, Kobayashi T, Sugimoto Y, Ichikawa A, Ushikubi F, Narumiya S, Saper CB (2003) Characteristics of thermoregulatory and febrile responses in mice deficient in prostaglandin EP1 and EP3 receptors. *J Physiol* 551:945-954.

- Opal SM, DePalo VA (2000) Anti-inflammatory cytokines. *Chest* 117:1162-1172.
- Owen N, Steptoe A (2003) Natural killer cell and proinflammatory cytokine responses to mental stress: associations with heart rate and heart rate variability. *Biol Psychol* 63:101-115.
- Ozawa H, Ito T, Ochiai I, Kawata M (1999) Cellular localization and distribution of glucocorticoid receptor immunoreactivity and the expression of glucocorticoid receptor messenger RNA in rat pituitary gland. A combined double immunohistochemistry study and in situ hybridization histochemical analysis. *Cell Tissue Res* 295:207-214.
- Pace TW, Hu F, Miller AH (2007) Cytokine-effects on glucocorticoid receptor function: relevance to glucocorticoid resistance and the pathophysiology and treatment of major depression. *Brain Behav Immun* 21:9-19.
- Pahan K, Jana M, Liu X, Taylor BS, Wood C, Fischer SM (2002) Gemfibrozil, a lipid-lowering drug, inhibits the induction of nitric-oxide synthase in human astrocytes. *J Biol Chem* 277:45984-45991.
- Papadimitriou A, Priftis KN (2009) Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Neuroimmunomodulation* 16:265-271.
- Paxinos G, Watson C (1998) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 4th edn. San Diego: Academic Press.
- Pelletier N, Boudreau F, Yu SJ, Zannoni S, Boulanger V, Asselin C (1998) Activation of haptoglobin gene expression by cAMP involves CCAAT/enhancer-binding protein isoforms in intestinal epithelial cells. *FEBS Lett* 439:275-280.
- Perez Castro C, Carbia Nagashima A, Paez Pereda M, Goldberg V, Chervin A, Carrizo G, Molina H, Renner U, Stalla GK, Arzt E (2001) Effects of the gp130 cytokines ciliary neurotrophic factor (CNTF) and interleukin-11 on pituitary cells: CNTF receptors on human pituitary adenomas and stimulation of prolactin and GH secretion in normal rat anterior pituitary aggregate cultures. *J Endocrinol* 169:539-547.
- Pfaffl MW (2004) Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum Sonderausgabe* 10:92-95.
- Pirkmajer S, Chibalin AV (2011) Serum starvation: caveat emptor. *Am J Physiol Cell Physiol* 301:C272-279.
- Pitossi F, del Rey A, Kabiersch A, Besedovsky H (1997) Induction of cytokine transcripts in the central nervous system and pituitary following peripheral administration of endotoxin to mice. *Journal of neuroscience research* 48:287-298.
- Poli V (1998) The role of C/EBP isoforms in the control of inflammatory and native immunity functions. *J Biol Chem* 273:29279-29282.
- Poli V, Mancini FP, Cortese R (1990) IL-6DBP, a nuclear protein involved in interleukin-6 signal transduction, defines a new family of leucine zipper proteins related to C/EBP. *Cell* 63:643-653.
- Pope RM, Leutz A, Ness SA (1994a) C/EBP beta regulation of the tumor necrosis factor alpha gene. *J Clin Invest* 94:1449-1455.
- Pope RM, Leutz A, Ness SA (1994b) C/EBP beta regulation of the tumor necrosis factor alpha gene. *J Clin Invest* 94:1449-1455.

- Pope RM, Lovis R, Mungre S, Perlman H, Koch AE, Haines GK, 3rd (1999) C/EBP beta in rheumatoid arthritis: correlation with inflammation, not disease specificity. *Clin Immunol* 91:271-282.
- Poupart P, Vandenabeele P, Cayphas S, Van Snick J, Haegeman G, Kruys V, Fiers W, Content J (1987) B cell growth modulating and differentiating activity of recombinant human 26-kd protein (BSF-2, HuIFN-beta 2, HPGF). *Embo J* 6:1219-1224.
- Pozzoli G, Mancuso C, Mirtella A, Preziosi P, Grossman AB, Navarra P (1994) Carbon monoxide as a novel neuroendocrine modulator: inhibition of stimulated corticotropin-releasing hormone release from acute rat hypothalamic explants. *Endocrinology* 135:2314-2317.
- Qian J, Zhu L, Li Q, Belevych N, Chen Q, Zhao F, Herness S, Quan N (2012) Interleukin-1R3 mediates interleukin-1-induced potassium current increase through fast activation of Akt kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:12189-12194.
- Raetz CR (1990) Biochemistry of endotoxins. *Annu Rev Biochem* 59:129-170.
- Ramji DP, Foka P (2002) CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem J* 365:561-575.
- Ray A, Prefontaine KE (1994) Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF-kappa B and the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:752-756.
- Ray D, Melmed S (1997) Pituitary cytokine and growth factor expression and action. *Endocr Rev* 18:206-228.
- Renner U, De Santana EC, Gerez J, Frohlich B, Haedo M, Pereda MP, Onofri C, Stalla GK, Arzt E (2009) Intrapituitary expression and regulation of the gp130 cytokine interleukin-6 and its implication in pituitary physiology and pathophysiology. *Ann N Y Acad Sci* 1153:89-97.
- Renner U, Gloddek J, Pereda MP, Arzt E, Stalla GK (1998) Regulation and role of intrapituitary IL-6 production by folliculostellate cells. *Domest Anim Endocrinol* 15:353-362.
- Renner U, Pagotto U, Arzt E, Stalla GK (1996) Autocrine and paracrine roles of polypeptide growth factors, cytokines and vasogenic substances in normal and tumorous pituitary function and growth: a review. *Eur J Endocrinol* 135:515-532.
- Rettori V, Milenkovic L, Beutler BA, McCann SM (1989) Hypothalamic action of cachectin to alter pituitary hormone release. *Brain Res Bull* 23:471-475.
- Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, Mamat U, Schmidt G, Loppnow H, Ulmer AJ, Zahringer U, Seydel U, Di Padova F (1994) Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *Faseb J* 8:217-225.
- Rinehart JF, Farquhar MG (1953) Electron microscopic studies of the anterior pituitary gland. *J Histochem Cytochem* 1:93-113.
- Rivest S (2003) Molecular insights on the cerebral innate immune system. *Brain Behav Immun* 17:13-19.
- Rivier C, Vale W (1991) Stimulatory effect of interleukin-1 on adrenocorticotropin secretion in the rat: is it modulated by prostaglandins? *Endocrinology* 129:384-388.

- Romanovsky AA (2007) Thermoregulation: some concepts have changed. Functional architecture of the thermoregulatory system. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292:R37-46.
- Romanovsky AA, Simons CT, Szekely M, Kulchitsky VA (1997) The vagus nerve in the thermoregulatory response to systemic inflammation. *Am J Physiol* 273:R407-413.
- Ross G, Hübschle T, Pehl U, Braun HA, Voigt K, Gerstberger R, Roth J (2003) Fever induction by localized subcutaneous inflammation in guinea pigs: the role of cytokines and prostaglandins. *J Appl Physiol* 94:1395-1402.
- Roth J, Conn CA, Kluger MJ, Zeisberger E (1993) Kinetics of systemic and intrahypothalamic IL-6 and tumor necrosis factor during endotoxin fever in guinea pigs. *Am J Physiol* 265:R653-658.
- Roth J, De Souza GE (2001) Fever induction pathways: evidence from responses to systemic or local cytokine formation. *Braz J Med Biol Res* 34:301-314.
- Roth J, Harré EM, Rummel C, Gerstberger R, Hübschle T (2004) Signaling the brain in systemic inflammation: role of sensory circumventricular organs. *Front Biosci* 9:290-300.
- Roth J, Martin D, Storr B, Zeisberger E (1998) Neutralization of pyrogen-induced tumour necrosis factor by its type 1 soluble receptor in guinea-pigs: effects on fever and interleukin-6 release. *J Physiol* 509 (Pt 1):267-275.
- Roth J, Rummel C, Barth SW, Gerstberger R, Hübschle T (2006) Molecular aspects of fever and hyperthermia. *Neurol Clin* 24:421-439, v.
- Roth J, Rummel C, Barth SW, Gerstberger R, Hübschle T (2009) Molecular aspects of fever and hyperthermia. *Immunol Allergy Clin North Am* 29:229-245.
- Roth J, Rummel C, Harré E. M., Voss, T., Mütze, J., Gerstberger, R., Hübschle, T. (2004) Is interleukin-6 the necessary pyrogenic cytokine? *Journal of Thermal Biology* 29:383-389.
- Rudaya AY, Steiner AA, Robbins JR, Dragic AS, Romanovsky AA (2005) Thermoregulatory responses to lipopolysaccharide in the mouse: dependence on the dose and ambient temperature. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289:R1244-1252.
- Ruetten H, Thiernemann C (1997) Effects of tyrphostins and genistein on the circulatory failure and organ dysfunction caused by endotoxin in the rat: a possible role for protein tyrosine kinase. *Br J Pharmacol* 122:59-70.
- Rummel C, Hübschle T, Gerstberger R, Roth J (2004) Nuclear translocation of the transcription factor STAT3 in the guinea pig brain during systemic or localised inflammation. *J Physiol* 557:671-687.
- Rummel C, Inoue W, Poole S, Luheshi GN (2010) Leptin regulates leukocyte recruitment into the brain following systemic LPS-induced inflammation. *Mol Psychiatry* 15:523-534.
- Rummel C, Inoue W, Sachot C, Poole S, Hübschle T, Luheshi GN (2008) Selective contribution of interleukin-6 and leptin to brain inflammatory signals induced by systemic LPS injection in mice. *J Comp Neurol* 511:373-395.
- Rummel C, Matsumura K, Luheshi GN (2011) Circulating IL-6 contributes to peripheral LPS-induced mPGES-1 expression in the rat brain. *Brain Res Bull* 86:319-325.

- Rummel C, Sachot C, Poole S, Luheshi GN (2006) Circulating interleukin-6 induces fever through a STAT3-linked activation of COX-2 in the brain. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291:R1316-1326.
- Rummel C, Voss T, Matsumura K, Korte S, Gerstberger R, Roth J, Hübschle T (2005) Nuclear STAT3 translocation in guinea pig and rat brain endothelium during systemic challenge with lipopolysaccharide and interleukin-6. *J Comp Neurol* 491:1-14.
- Sah P, Faber ES, Lopez De Armentia M, Power J (2003) The amygdaloid complex: anatomy and physiology. *Physiol Rev* 83:803-834.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491.
- Saito N, Pulford KA, Breton-Gorius J, Masse JM, Mason DY, Cramer EM (1991) Ultrastructural localization of the CD68 macrophage-associated antigen in human blood neutrophils and monocytes. *Am J Pathol* 139:1053-1059.
- Sasaki A, Yasukawa H, Suzuki A, Kamizono S, Syoda T, Kinjyo I, Sasaki M, Johnston JA, Yoshimura A (1999) Cytokine-inducible SH2 protein-3 (CIS3/SOCS3) inhibits Janus tyrosine kinase by binding through the N-terminal kinase inhibitory region as well as SH2 domain. *Genes Cells* 4:339-351.
- Scammell TE, Elmquist JK, Griffin JD, Saper CB (1996) Ventromedial preoptic prostaglandin E2 activates fever-producing autonomic pathways. *J Neurosci* 16:6246-6254.
- Scheinman RI, Gualberto A, Jewell CM, Cidlowski JA, Baldwin AS, Jr. (1995) Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF-kappa B by activated glucocorticoid receptors. *Mol Cell Biol* 15:943-953.
- Schiltz JC, Sawchenko PE (2002a) Distinct brain vascular cell types manifest inducible cyclooxygenase expression as a function of the strength and nature of immune insults. *J Neurosci* 22:5606-5618.
- Schiltz JC, Sawchenko PE (2002b) Distinct brain vascular cell types manifest inducible cyclooxygenase expression as a function of the strength and nature of immune insults. *J Neurosci* 22:5606-5618.
- Schindler C, Fu XY, Improta T, Aebersold R, Darnell JE, Jr. (1992) Proteins of transcription factor ISGF-3: one gene encodes the 91- and 84-kDa ISGF-3 proteins that are activated by interferon alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:7836-7839.
- Schindler R, Mancilla J, Endres S, Ghorbani R, Clark SC, Dinarello CA (1990) Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. *Blood* 75:40-47.
- Schletter J, Heine H, Ulmer AJ, Rietschel ET (1995) Molecular mechanisms of endotoxin activity. *Arch Microbiol* 164:383-389.
- Schooltink H, Rose-John S (2002) Cytokines as therapeutic drugs. *J Interferon Cytokine Res* 22:505-516.
- Schroeder-Gloeckler JM, Rahman SM, Janssen RC, Qiao L, Shao J, Roper M, Fischer SJ, Lowe E, Orlicky DJ, McManaman JL, Palmer C, Gitomer WL, Huang W, O'Doherty RM, Becker TC, Klemm DJ, Jensen DR, Pulawa LK, Eckel RH, Friedman JE (2007)

- CCAAT/enhancer-binding protein beta deletion reduces adiposity, hepatic steatosis, and diabetes in *Lepr(db/db)* mice. *J Biol Chem* 282:15717-15729.
- Schumann RR, Leong SR, Flaggs GW, Gray PW, Wright SD, Mathison JC, Tobias PS, Ulevitch RJ (1990) Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science* 249:1429-1431.
- Screpanti I, Romani L, Musiani P, Modesti A, Fattori E, Lazzaro D, Sellitto C, Scarpa S, Bellavia D, Lattanzio G, et al. (1995) Lymphoproliferative disorder and imbalanced T-helper response in *C/EBP beta*-deficient mice. *Embo J* 14:1932-1941.
- Sehic E, Blatteis CM (1996) Blockade of lipopolysaccharide-induced fever by subdiaphragmatic vagotomy in guinea pigs. *Brain Res* 726:160-166.
- Sehic E, Ungar AL, Blatteis CM (1996) Interaction between norepinephrine and prostaglandin E2 in the preoptic area of guinea pigs. *Am J Physiol* 271:R528-536.
- Selye H (1951) The general-adaptation-syndrome. *Annu Rev Med* 2:327-342.
- Semenza GL (2000) Oxygen-regulated transcription factors and their role in pulmonary disease. *Respir Res* 1:159-162.
- Sen R, Baltimore D (1986) Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein *Nf-kappa B* by a posttranslational mechanism. *Cell* 47:921-928.
- Serrats J, Schiltz JC, Garcia-Bueno B, van Rooijen N, Reyes TM, Sawchenko PE (2010) Dual roles for perivascular macrophages in immune-to-brain signaling. *Neuron* 65:94-106.
- Sessler DI (2008) Temperature monitoring and perioperative thermoregulation. *Anesthesiology* 109:318-338.
- Shapiro RE, Miselis RR (1985) The central neural connections of the area postrema of the rat. *J Comp Neurol* 234:344-364.
- Sharp BM, Matta SG, Peterson PK, Newton R, Chao C, McAllen K (1989) Tumor necrosis factor-alpha is a potent ACTH secretagogue: comparison to interleukin-1 beta. *Endocrinology* 124:3131-3133.
- Shibata H, Nagasaka T (1984) Role of sympathetic nervous system in immobilization- and cold-induced brown adipose tissue thermogenesis in rats. *Jpn J Physiol* 34:103-111.
- Shintani F, Nakaki T, Kanba S, Kato R, Asai M (1995a) Role of interleukin-1 in stress responses. A putative neurotransmitter. *Mol Neurobiol* 10:47-71.
- Shintani F, Nakaki T, Kanba S, Sato K, Yagi G, Shiozawa M, Aiso S, Kato R, Asai M (1995b) Involvement of interleukin-1 in immobilization stress-induced increase in plasma adrenocorticotrophic hormone and in release of hypothalamic monoamines in the rat. *J Neurosci* 15:1961-1970.
- Siebenlist U, Franzoso G, Brown K (1994) Structure, regulation and function of *NF-kappa B*. *Annu Rev Cell Biol* 10:405-455.
- Silverman AJ, Hoffman DL, Zimmerman EA (1981) The descending afferent connections of the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN). *Brain Res Bull* 6:47-61.
- Silverman MN, Pearce BD, Biron CA, Miller AH (2005) Immune modulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis during viral infection. *Viral Immunol* 18:41-78.
- Sims JE, Dower SK (1994) Interleukin-1 receptors. *Eur Cytokine Netw* 5:539-546.

- Singer R, Harker CT, Vander AJ, Kluger MJ (1986a) Hyperthermia induced by open-field stress is blocked by salicylate. *Physiol Behav* 36:1179-1182.
- Singer R, Harker CT, Vander AJ, Kluger MJ (1986b) Hyperthermia induced by open-field stress is blocked by salicylate. *Physiol Behav* 36:1179-1182.
- Siso S, Jeffrey M, Gonzalez L (2010) Sensory circumventricular organs in health and disease. *Acta Neuropathol* 120:689-705.
- Smith EM, Cadet P, Stefano GB, Opp MR, Hughes TK, Jr. (1999) IL-10 as a mediator in the HPA axis and brain. *J Neuroimmunol* 100:140-148.
- Soszynski D, Kozak W, Conn CA, Rudolph K, Kluger MJ (1996) Beta-adrenoceptor antagonists suppress elevation in body temperature and increase in plasma IL-6 in rats exposed to open field. *Neuroendocrinology* 63:459-467.
- Spangelo BL, deHoll PD, Kalabay L, Bond BR, Arnaud P (1994) Neurointermediate pituitary lobe cells synthesize and release interleukin-6 in vitro: effects of lipopolysaccharide and interleukin-1 beta. *Endocrinology* 135:556-563.
- Spangelo BL, Isakson PC, MacLeod RM (1990a) Production of interleukin-6 by anterior pituitary cells is stimulated by increased intracellular adenosine 3',5'-monophosphate and vasoactive intestinal peptide. *Endocrinology* 127:403-409.
- Spangelo BL, Judd AM, Isakson PC, MacLeod RM (1991) Interleukin-1 stimulates interleukin-6 release from rat anterior pituitary cells in vitro. *Endocrinology* 128:2685-2692.
- Spangelo BL, Judd AM, MacLeod RM, Goodman DW, Isakson PC (1990b) Endotoxin-induced release of interleukin-6 from rat medial basal hypothalamus. *Endocrinology* 127:1779-1785.
- Spangelo BL, MacLeod RM, Isakson PC (1990c) Production of interleukin-6 by anterior pituitary cells in vitro. *Endocrinology* 126:582-586.
- Sreedharan SP, Huang JX, Cheung MC, Goetzl EJ (1995) Structure, expression, and chromosomal localization of the type I human vasoactive intestinal peptide receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:2939-2943.
- Sriram K, Benkovic SA, Hebert MA, Miller DB, O'Callaghan JP (2004) Induction of gp130-related cytokines and activation of JAK2/STAT3 pathway in astrocytes precedes up-regulation of glial fibrillary acidic protein in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of neurodegeneration: key signaling pathway for astrogliosis in vivo? *J Biol Chem* 279:19936-19947.
- Staiger J, Lueben MJ, Berrigan D, Malik R, Perkins SN, Hursting SD, Johnson PF (2009) C/EBPbeta regulates body composition, energy balance-related hormones and tumor growth. *Carcinogenesis* 30:832-840.
- Steiner AA, Branco LG (2000) Central CO-heme oxygenase pathway raises body temperature by a prostaglandin-independent way. *J Appl Physiol* 88:1607-1613.
- Steiner AA, Hunter JC, Phipps SM, Nucci TB, Oliveira DL, Roberts JL, Scheck AC, Simmons DL, Romanovsky AA (2009) Cyclooxygenase-1 or -2--which one mediates lipopolysaccharide-induced hypothermia? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 297:R485-494.

- Steiner AA, Ivanov AI, Serrats J, Hosokawa H, Phayre AN, Robbins JR, Roberts JL, Kobayashi S, Matsumura K, Sawchenko PE, Romanovsky AA (2006) Cellular and molecular bases of the initiation of fever. *PLoS Biol* 4:e284.
- Stephan FK, Zucker I (1972) Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69:1583-1586.
- Stephanou A, Okosi A, Knight RA, Chowdrey HS, Latchman DS (1997) C/EBP activates the human corticotropin-releasing hormone gene promoter. *Mol Cell Endocrinol* 134:41-50.
- Step toe A, Hamer M, Chida Y (2007) The effects of acute psychological stress on circulating inflammatory factors in humans: a review and meta-analysis. *Brain Behav Immun* 21:901-912.
- Step toe A, Willemsen G, Owen N, Flower L, Mohamed-Ali V (2001) Acute mental stress elicits delayed increases in circulating inflammatory cytokine levels. *Clin Sci (Lond)* 101:185-192.
- Sterneck E, Johnson PF (1998) CCAAT/enhancer binding protein beta is a neuronal transcriptional regulator activated by nerve growth factor receptor signaling. *J Neurochem* 70:2424-2433.
- Sterneck E, Tessarollo L, Johnson PF (1997) An essential role for C/EBPbeta in female reproduction. *Genes Dev* 11:2153-2162.
- Stitt JT (1986) Prostaglandin E as the neural mediator of the febrile response. *Yale J Biol Med* 59:137-149.
- Stojilkovic SS (2001) A novel view of the function of pituitary folliculo-stellate cell network. *Trends Endocrinol Metab* 12:378-380.
- Straub RH, Harle P, Sarzi-Puttini P, Cutolo M (2006) Tumor necrosis factor-neutralizing therapies improve altered hormone axes: an alternative mode of antiinflammatory action. *Arthritis Rheum* 54:2039-2046.
- Sun W, Choi SH, Park SK, Kim SJ, Noh MR, Kim EH, Kim HJ, Kim H (2007) Identification and characterization of novel activity-dependent transcription factors in rat cortical neurons. *J Neurochem* 100:269-278.
- Suzuki E, Shintani F, Kanba S, Asai M, Nakaki T (1997) Immobilization stress increases mRNA levels of interleukin-1 receptor antagonist in various rat brain regions. *Cell Mol Neurobiol* 17:557-562.
- Szekely M, Szelenyi Z (1979) Endotoxin fever in the rat. *Acta Physiol Acad Sci Hung* 53:265-277.
- Taga T, Kishimoto T (1997) Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu Rev Immunol* 15:797-819.
- Takahashi Y, Smith P, Ferguson A, Pittman QJ (1997) Circumventricular organs and fever. *Am J Physiol* 273:R1690-1695.
- Takeda K, Akira S (2000) STAT family of transcription factors in cytokine-mediated biological responses. *Cytokine Growth Factor Rev* 11:199-207.

- Takeda K, Noguchi K, Shi W, Tanaka T, Matsumoto M, Yoshida N, Kishimoto T, Akira S (1997) Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:3801-3804.
- Tanaka M, Yoshida M, Emoto H, Ishii H (2000) Noradrenaline systems in the hypothalamus, amygdala and locus coeruleus are involved in the provocation of anxiety: basic studies. *Eur J Pharmacol* 405:397-406.
- Tanaka T, Akira S, Yoshida K, Umemoto M, Yoneda Y, Shirafuji N, Fujiwara H, Suematsu S, Yoshida N, Kishimoto T (1995) Targeted disruption of the NF-IL6 gene discloses its essential role in bacteria killing and tumor cytotoxicity by macrophages. *Cell* 80:353-361.
- Tatsuno I, Somogyvari-Vigh A, Mizuno K, Gottschall PE, Hidaka H, Arimura A (1991) Neuropeptide regulation of interleukin-6 production from the pituitary: stimulation by pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and calcitonin gene-related peptide. *Endocrinology* 129:1797-1804.
- Taubenfeld SM, Milekic MH, Monti B, Alberini CM (2001) The consolidation of new but not reactivated memory requires hippocampal C/EBPbeta. *Nat Neurosci* 4:813-818.
- Thomson AW (1994) *The Cytokine Handbook*, 2nd edn. London: Academic Press.
- Tilders FJ, DeRijk RH, Van Dam AM, Vincent VA, Schotanus K, Persoons JH (1994) Activation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis by bacterial endotoxins: routes and intermediate signals. *Psychoneuroendocrinology* 19:209-232.
- Tilg H, Trehu E, Atkins MB, Dinarello CA, Mier JW (1994) Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. *Blood* 83:113-118.
- Tsukiyama N, Saida Y, Kakuda M, Shintani N, Hayata A, Morita Y, Tanida M, Tajiri M, Hazama K, Ogata K, Hashimoto H, Baba A (2011) PACAP centrally mediates emotional stress-induced corticosterone responses in mice. *Stress* 14:368-375.
- Turnbull AV, Prehar S, Kennedy AR, Little RA, Hopkins SJ (2003) Interleukin-6 is an afferent signal to the hypothalamo-pituitary-adrenal axis during local inflammation in mice. *Endocrinology* 144:1894-1906.
- Turnbull AV, Rivier CL (1999) Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. *Physiol Rev* 79:1-71.
- Turner R, Tjian R (1989) Leucine repeats and an adjacent DNA binding domain mediate the formation of functional cFos-cJun heterodimers. *Science* 243:1689-1694.
- Uematsu S, Matsumoto M, Takeda K, Akira S (2002) Lipopolysaccharide-dependent prostaglandin E(2) production is regulated by the glutathione-dependent prostaglandin E(2) synthase gene induced by the Toll-like receptor 4/MyD88/NF-IL6 pathway. *J Immunol* 168:5811-5816.
- Ueno Y, Takano N, Kanegane H, Yokoi T, Yachie A, Miyawaki T, Taniguchi N (1989) The acute phase nature of interleukin 6: studies in Kawasaki disease and other febrile illnesses. *Clin Exp Immunol* 76:337-342.
- Ulrich-Lai YM, Herman JP (2009) Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat Rev Neurosci* 10:397-409.
- Ushikubi F, Segi E, Sugimoto Y, Murata T, Matsuoka T, Kobayashi T, Hizaki H, Tuboi K, Katsuyama M, Ichikawa A, Tanaka T, Yoshida N, Narumiya S (1998) Impaired

- febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP3. *Nature* 395:281-284.
- Vallières L, Rivest S (1997) Regulation of the genes encoding interleukin-6, its receptor, and gp130 in the rat brain in response to the immune activator lipopolysaccharide and the proinflammatory cytokine interleukin-1beta. *J Neurochem* 69:1668-1683.
- Van Dam AM, Bauer J, Tilders FJ, Berkenbosch F (1995) Endotoxin-induced appearance of immunoreactive interleukin-1 beta in ramified microglia in rat brain: a light and electron microscopic study. *Neuroscience* 65:815-826.
- Vermes I, Beishuizen A, Hampsink RM, Haanen C (1995) Dissociation of plasma adrenocorticotropin and cortisol levels in critically ill patients: possible role of endothelin and atrial natriuretic hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 80:1238-1242.
- Vilcék J, Le, J. (1994) Immunology of cytokines: an introduction. In: *The Cytokine Handbook*(Thomson, A. W., ed), pp 1-20 London: Academic press.
- Vinkers CH, Groenink L, van Bogaert MJ, Westphal KG, Kalkman CJ, van Oorschot R, Oosting RS, Olivier B, Korte SM (2009) Stress-induced hyperthermia and infection-induced fever: two of a kind? *Physiol Behav* 98:37-43.
- Wang ND, Finegold MJ, Bradley A, Ou CN, Abdelsayed SV, Wilde MD, Taylor LR, Wilson DR, Darlington GJ (1995) Impaired energy homeostasis in C/EBP alpha knockout mice. *Science* 269:1108-1112.
- Watkins LR, Maier SF, Goehler LE (1995) Cytokine-to-brain communication: a review & analysis of alternative mechanisms. *Life Sci* 57:1011-1026.
- Weigent DA, Blalock JE (1995) Associations between the neuroendocrine and immune systems. *J Leukoc Biol* 58:137-150.
- Welm AL, Timchenko NA, Darlington GJ (1999) C/EBPalpha regulates generation of C/EBPbeta isoforms through activation of specific proteolytic cleavage. *Mol Cell Biol* 19:1695-1704.
- Wesche H, Henzel WJ, Shillinglaw W, Li S, Cao Z (1997) MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity* 7:837-847.
- Wickert Hu (2007) Die quantitative realtime-PCR (qRT-PCR). *Biologie in unserer Zeit* 37:120-126.
- Willcox BJ, Poulin P, Veale WL, Pittman QJ (1992) Vasopressin-induced motor effects: localization of a sensitive site in the amygdala. *Brain Res* 596:58-64.
- Williams SC, Baer M, Dillner AJ, Johnson PF (1995) CRP2 (C/EBP beta) contains a bipartite regulatory domain that controls transcriptional activation, DNA binding and cell specificity. *Embo J* 14:3170-3183.
- Wu CT, Eiserich JP, Ansari AA, Coppel RL, Balasubramanian S, Bowlus CL, Gershwin ME, Van De Water J (2003) Myeloperoxidase-positive inflammatory cells participate in bile duct damage in primary biliary cirrhosis through nitric oxide-mediated reactions. *Hepatology* 38:1018-1025.
- Wuchert F, Ott D, Murgott J, Rafalzik S, Hitzel N, Roth J, Gerstberger R (2008) Rat area postrema microglial cells act as sensors for the toll-like receptor-4 agonist lipopolysaccharide. *J Neuroimmunol* 204:66-74.

- Wuchert F, Ott D, Rafalzik S, Roth J, Gerstberger R (2009) Tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta and nitric oxide induce calcium transients in distinct populations of cells cultured from the rat area postrema. *J Neuroimmunol* 206:44-51.
- Wust S, Wolf J, Hellhammer DH, Federenko I, Schommer N, Kirschbaum C (2000) The cortisol awakening response - normal values and confounds. *Noise Health* 2:79-88.
- Xin L, Blatteis CM (1992) Hypothalamic neuronal responses to interleukin-6 in tissue slices: effects of indomethacin and naloxone. *Brain Res Bull* 29:27-35.
- Xuan YT, Guo Y, Han H, Zhu Y, Bolli R (2001) An essential role of the JAK-STAT pathway in ischemic preconditioning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:9050-9055.
- Yin M, Yang SQ, Lin HZ, Lane MD, Chatterjee S, Diehl AM (1996) Tumor necrosis factor alpha promotes nuclear localization of cytokine-inducible CCAAT/enhancer binding protein isoforms in hepatocytes. *J Biol Chem* 271:17974-17978.
- Yoshida Y, Kumar A, Koyama Y, Peng H, Arman A, Boch JA, Auron PE (2004) Interleukin 1 activates STAT3/nuclear factor-kappaB cross-talk via a unique TRAF6- and p65-dependent mechanism. *J Biol Chem* 279:1768-1776.
- Zeisberger E (1999) From humoral fever to neuroimmunological control of fever. *Journal of Thermal Biology* 24:287-326.
- Zhao J, Unelius L, Bengtsson T, Cannon B, Nedergaard J (1994) Coexisting beta-adrenoceptor subtypes: significance for thermogenic process in brown fat cells. *Am J Physiol* 267:C969-979.
- Zhou D, Kusnecov AW, Shurin MR, DePaoli M, Rabin BS (1993) Exposure to physical and psychological stressors elevates plasma interleukin 6: relationship to the activation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Endocrinology* 133:2523-2530.

IX. ANHANG

22. Publikationen

22.1. Zitierbare Kurzmitteilungen

- **Fuchs F., Damm J., Gerstberger R., Roth J. and Rummel C. (2012)** The inflammatory transcription factor NF-IL6 is linked to the activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal stress axis in rats. *Brain Behav Immun* 26, (Suppl. 1): s7-s8.
- **Schneiders J., Fuchs F., Damm J., Gerstberger R., Soares DM., Roth J., Rummel C. (2013)** Nuclear factor interleukin 6 deficient mice show reduced locomotor activity and dose dependant alterations in fever and recruitment of neutrophil granulocytes to the brain during LPS-induced systemic inflammation. *Brain Behav Immun*

23. Danksagung

Mein größter Dank gilt PD Dr. Christoph Rummel für seine hervorragende und außergewöhnlich engagierte Betreuung mit viel Geduld, Vertrauen und Verständnis in jeder Lebenslage. Er war maßgeblich an meiner beruflichen und persönlichen Weiterentwicklung beteiligt und das nicht nur durch die Möglichkeit Erfahrungen auf einem ausländischen Kongress zu sammeln und internationale Kontakte zu knüpfen.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Rüdiger Gerstberger für die Möglichkeit meine Dissertation im Institut für Veterinär-Physiologie und -Biochemie anfertigen zu können, für seine sehr gute fachliche Unterstützung, sein Verständnis und seine Großzügigkeit.

Vielen Dank auch an Herrn Prof. Dr. Joachim Roth für die immer offene Tür mit „Gratis-Beratung“, zündenden Ideen und aufmunternden Sprüchen. Der Ariel wird Dich vermissen!

Ein großer Dank gilt Daniela Ott für ihre sehr kompetente Unterstützung in vielen methodischen Fragen sowie für ihre professionelle Zusammenarbeit. Sie hat mit ihrer positiven Art, ihrem Enthusiasmus und den tollen Gesprächen wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Des Weiteren danke ich Jolanta Murgott nicht nur für die Unterstützung bei der Durchführung der Bioassays, sondern vor allem für die liebevollen und aufmunternden Worte.

Doreen Marks danke ich für ihre Zuverlässigkeit und ansteckende Fröhlichkeit, die Einarbeitung in Telemetrie- und Immunotechniken und die tolle Unterstützung bei den „Kältearbeiten“ in der letzten Phase der Doktorarbeit.

Herrn Michael Haas und Herrn Jan Rodrigues-Fonseca danke ich für die sorgfältige Versorgung und Pflege der NF-IL6-Knock-out-Mäuse und der Ratten.

Herrn Gerd Herber und Herrn Alexander Heinrich danke ich für die kompetente Hilfe und für ihre Maßanfertigungen für den S1-Mäusestall.

Dr. Jelena Damm danke ich für die hervorragende Zusammenarbeit und die Weitergabe von Protokollen.

Meinen Freunden und vor allem Dotti danke ich für ihre Unterstützung und die schönen und lustigen Ablenkungen.

Ein sehr großer Dank gilt vor allem meinen Eltern, meinen Geschwistern und meinen Großeltern ohne deren Verständnis, Unterstützung und Liebe ich nie so weit gekommen wäre und die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen und stehen.

Abschließend möchte ich mich bei meinem Verlobten Jens Rößner bedanken, der mir noch viel mehr als „nur“ Unterstützung, Zuspruch und Rückhalt gegeben hat. Seine unendliche Geduld, seine Liebe und die einzigartige Fähigkeit mich in jeder Situation zum Lachen zu bringen und die Dinge positiv zu sehen, machen die letzten drei Jahre für mich unvergesslich!

24. Erklärung

"Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlicher Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten."



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6036-7



9 783835 196036 7